



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITO DA RESTRIÇÃO DE GLICOSE ASSOCIADA AO  
TRATAMENTO COM QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGEM DE  
CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO *IN*  
*VITRO***

Carine Bropp Cardoso

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Beatriz Nedel

Florianópolis

Agosto de 2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bropp, Carine

Efeito da restrição de glicose associada ao tratamento  
com quimioterápicos em linhagem de células de glioblastoma  
multiforme humano in vitro / Carine Bropp ; orientador,  
Profa. Dra. Cláudia Beatriz Nedel - Florianópolis, SC,  
2015.

80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós  
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

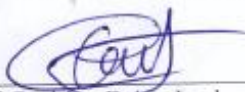
1. Neurociências. 2. Glioblastoma Multiforme. 3.  
Metabolismo tumoral. 4. Quimioterapia. 5. Estresse  
oxidativo. I. Beatriz Nedel , Profa. Dra. Cláudia. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Neurociências. III. Título.

**CARINE BROPP CARDOSO**

**“EFEITO DA RESTRIÇÃO DE GLICOSE ASSOCIADA  
AO TRATAMENTO COM QUIMIOTERÁPICOS EM  
LINHAGEM DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA  
MULTIFORME HUMANO *IN VITRO*”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 29 de outubro de 2015.



Prof. Rodrigo Balny Leal  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Prof. Cláudia B. Nedel Mendes de Aguiar  
Orientadora – UFSC

  
Prof. Marcelo Farina  
Membro - UFSC  
Prof. Manuella Pinto Kaster  
Membro externo ao Programa  
Prof. Nelson Horácio Gabilan  
Membro - UFSC



À minha mãe Alda, por toda paciência, investimento e dedicação em mim. Aos meus irmãos, Cláudia, Serginho e Crystiane, e ao meu amigo Lucas, o apoio de vocês foi essencial. Amo-os.



## AGRADECIMENTOS

A elaboração e finalização deste trabalho teve envolvimento direto e indireto de muitas pessoas, e considero como envolvimento indireto o apoio e a força que minha família e amigos me deram. Agradeço à minha família, que é grande, e faço questão de citar a todos: minha mãe Alda, que, à sua maneira de amar, me ensinou que o importante é fazer o que precisa ser feito, respirar fundo e proceder sempre; aos meus irmãos Cláudia, Crystiane e Serginho. Ah, e agradeço a minha sobrinha Maria Clara, que ainda não nasceu, mas encheu meu coração de felicidade quando anunciou que vinha. Vocês são parte de mim, e eu de vocês.

Aos amigos Lucas, Andressa, Jefferson, Miguel, Camila, Bruna, Maisa, Scheylane e Bruno, gostaria de citar todos, mas o espaço é restrito. Todos vocês foram muito importantes nesse caminho, sendo pelo apoio, pelos momentos de distração e nas conversas sérias, que me nortearam muitas vezes. Em especial, ao meu querido amigo Lucas, seu auxílio e apoio foram inesquecíveis e indispensáveis. Amizade eterna é como a que nós temos, com reciprocidade de importâncias e carinhos.

Aos colegas e professores que tiveram envolvimento direto nesse trabalho, professora e orientadora Cláudia, doutoranda Karen e Flávia, do grupo de gliomas. Muito obrigada pela ajuda e paciência. Também agradeço à Tharine, Daiane, Laise e aos demais colegas do laboratório de Neuroquímica 4, que contribuíram com a rotina de trabalho e tirando minhas dúvidas quando precisei, em especial à professora Carla, que cedeu seu espaço para que este trabalho pudesse ser elaborado. Foi bom compartilhar esse momento com vocês, desejo sucesso a todos.

Enfim, agradeço a PPGNeuro e seus professores, ao secretário Nivaldo que me ajudou muitas vezes com assuntos burocráticos. Agradeço à CAPES pelo financiamento e à UFSC por todos esses anos de estudo, entre graduação e mestrado.





## RESUMO

Glioblastomas multiformes (GBM) são tumores sólidos de origem glial classificados como nível IV pela OMS, considerados altamente invasivos e possuem alta taxa proliferativa. Células de glioma possuem metabolismo energético diferencial que consiste na tendência em utilizar a glicose para formação de ATP via glicólise anaeróbica, mesmo em presença de oxigênio, característica conhecida como efeito Warburg. A preferência pela quebra da glicose como fonte energética se caracteriza como uma adaptação metabólica que pode beneficiar o crescimento e expansão do tumor. As células de gliomas podem liberar glutamato em altas concentrações. A diminuição da oferta de glicose pode sensibilizar as células de gliomas, pois muitos tumores não possuem mecanismos protetores eficientes para metabolização de substratos alternativos. A Carmustina (BCNU) e a Temozolomida (TMZ) fazem parte de uma classe de fármacos citotóxicos conhecidos como alquilantes de ADN, e são substâncias utilizadas em quimioterapia para tumores cerebrais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento de restrição de glicose conjugado ao uso de quimioterápicos na indução de morte celular, formação de EROs, liberação de glutamato, migração e morfologia celular em células de linhagem primária de GBM *in vitro*, derivadas de ressecção cirúrgica e nomeadas GBM1 pelo grupo de pesquisa. O tratamento de restrição teve duração de 24 horas, e após esse período foram aplicados os quimioterápicos TMZ e BCNU na concentração de 400  $\mu$ M, por mais 24 horas. Os dados obtidos mostraram que a privação de glicose diminui a viabilidade destas células e, quando em conjunto com os quimioterápicos, foi possível notar uma sensibilização das células à ação dos fármacos. A formação de EROs no tratamento de 48 horas acompanha a diminuição da viabilidade e, nas primeiras horas (2, 4 e 6 horas), foi verificada diminuição nas concentrações de espécies reativas nos tratamentos de restrição em conjunto com BCNU. As taxas de liberação de glutamato não apresentaram modificações importantes. O tratamento diminuiu a migração celular e mostrou modificações na morfologia celular. A privação de glicose é uma possibilidade de tratamento alternativo não tóxico, e mostrou ter ação positiva contra as células GBM1.

**Palavras-chave:** glioblastoma multiforme, restrição de glicose, temozolomida, carmustina, câncer, morte celular, glutamato, migração celular, EROs.



## ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) are solid tumors of glial origin classified as level IV by WHO, considered highly invasive and with high proliferative rate. Glioma cells exhibit differential energy metabolism, with tendency to use glucose for ATP production through glycolysis, even in the presence of oxygen, a characteristic known as the Warburg Effect. This metabolic adaptation benefits the tumor growth and expansion. Glioma cells also have the characteristic of releasing high concentrations of glutamate. Decreased of glucose energy can sensitize gliomas cells because many tumors have no effective protective mechanisms for metabolizing alternative substrates. Carmustine (BCNU) and Temozolomide (TMZ) are cytotoxic drugs known as DNA alkylating agents, usually used in chemotherapy for brain tumors. The objective of this study was to evaluate the treatment effect of glucose restriction combined to chemotherapy in the induction of cell death, ROS formation, glutamate release, migration and cell morphology in primary cell line GBM vitro derived resection surgical and named GBM1 by the research group. Restriction treatment lasted for 24 hours and, after this period, TMZ and BCNU were applied at a concentration of 400  $\mu$ M, for 24 hours. Data showed that glucose deprivation decreases cell viability and, with chemotherapy, was possible to notice a sensitizing cells to the drugs. ROS formation after 48 hour treatment follow viability's decline. After early hours (2, 4 and 6 hours), was observed decrease in concentrations of reactive species in restriction combination with BCNU treatment. Glutamate release rates showed no significant changes. Treatment decreased cell migration and showed cells morphology changes. Glucose deprivation is a possibility of non-toxic and alternative treatment, capable to increase cellular sensitivity to the chemotherapy and shown to have positive action against GBM1 cells.

**Keywords:** glioblastoma multiforme, glucose restriction, temozolomide, carmustine, cancer, glioma, cell death, glutamate, cell migration, ROS.



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1. Graduação dos tumores encefálicos segundo OMS.....22

Figura 1. Alquilação do Oxigênio na posição 6 da base nitrogenada guanina do ADN.....25

Figura 2. Passos do metabolismo da glicose em células normais.....26

Figura 3. Diferença entre as vias metabólicas de células de tecido diferenciado, células proliferativas e células tumorais.....27

### RESULTADOS

Figura 1. Privação de glicose altera viabilidade celular e células GBM1 em relação ao tempo de tratamento.....44

Figura 2. Privação de glicose possui efeito sinérgico com tratamento de quimioterápicos em células GBM1.....44

Figura 3. Dosagem de proteínas totais é diminuída significativamente nos tratamentos de restrição de glicose conjugado ao uso de TMZ e BCNU em células GBM1.....45

Figura 4. A quantificação de células apoptóticas e necróticas por citometria de fluxo em células GBM1.....47

Figura 5. Produção de EROS em células GBM1 no tempo de 48 horas após tratamento.....48

Figura 6. Produção de EROS em GBM1 nos tempos 2, 4 e 6 horas após tratamento.....49

Figura 7. Liberação de glutamato em células GBM1 após 48 horas de tratamento.....50

Figura 8. Ensaio de migração de migração celular em GBM1 em 24 e 48 horas de tratamento.....51

Figura 9. Microfotografias com marcadores fluorescentes Faloidina e Hoechst de células de GBM1 após 48 horas de tratamento.....52

## APÊNDICE

Figura 1. Microfotografias do ensaio de *Scratch Wound* em células de GBM1 mantidas em meio de 2 g/L e 0 g/L de glicose, em conjugação à ação dos quimioterápicos TMZ e BCNU.....77

## LISTA DE ABREVIATURAS DE SIGLAS

Acetil-CoA - Acetil-Coenzima A  
ADN - Ácido Desoxirribonucleico  
ADNmt - ADN mitocondrial  
ADP - Adenosina 5' Difosfato  
ANLSH - Hipótese da Reciprocidade Astrócito-Neurônio  
ATP - Adenosina 5' Trifosfato  
ATC - Ácido Tricarboxílico  
BCNU – Carmustina  
CEPH - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
 $C_3H_4O_3$  – Piruvato  
 $C_6H_{12}O_6$  – Glicose  
 $C_3H_6O_3$  – Lactato  
 $CO_2$  – Dióxido de Carbono  
CR – Restrição Calórica  
DCF - 2',7'- Diclorodihidrofluoresceína  
DCFH – 2',7'- Diclorodihidrofluorescina  
DCFH-DA - 2',7'- Diclorodihidrofluoresceína Diacetato  
DC – Dieta Cetônica  
DMEM - Meio de Cultura Modificado Dulbecco's  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
ERON – Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio  
EROS – Espécies Reativas de Oxigênio  
FAD - Flavina-Adenina Dinucleotídio Oxidada  
 $FADH_2$  – Flavina-Adenina Dinucleotídio Reduzida  
FITC - Anexina  
GABA - Ácido Gama Aminobutírico  
GBM - Glioblastoma Multiforme  
GLI - Glicose  
GLU – Glutamato  
GPx – Glutathione Peroxidase  
GSH – Glutathione Reduzida  
GSSG – Glutathione Oxidada  
GR – Glutathione Redutase  
 $H_2O_2$  – Peróxido de Hidrogênio  
HBSS - Solução Salina de Hanks  
 $H^+$  - Cátion Hidrogênio  
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-terazólio  
NADH – Nicotinamida-Adenina Dinucleotídio Reduzida

$\text{NAD}^+$  - Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo Oxidada

$\text{Na}^+$ -  $\text{K}^+$  ATPase – Bomba de Sódio e Potássio

OMS - Organização Mundial da Saúde

*OXPPOS* – Fosforilação Oxidativa

PBS – Tampão Fosfato Salino

PI – Iodeto de Propídio

PS – Fosfatidilserina

RE - Retículo Endoplasmático

SNC - Sistema Nervoso Central

SBF - Soro Bovino Fetal

TMZ – Temozolomida



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Tumores do SNC e Glioblastoma Multiforme.....	19
1.2. Agentes antineoplásicos: Temozolomida e Carmustina.....	23
1.3. Metabolismo Energético.....	25
1.4. Privação de glicose como tratamento metabólico para gliomas.....	28
1.5. Morte celular.....	30
1.6. Estresse oxidativo em células de glioma.....	31
1.7. Importância do glutamato nos processos tumorais.....	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1. Culturas celulares.....	37
3.2. Tratamento de restrição de glicose.....	37
3.3. Tratamento com quimioterápicos.....	38
3.4. Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	38
3.5. Quantificação dos níveis intracelulares de EROs.....	39
3.6. Ensaio de análise de apoptose e necrose.....	39
3.7. Liberação de glutamato.....	39
3.8. Dosagem de proteínas.....	40
3.9. Migração celular – Ensaio de Scratch Wound.....	40

3.10. Microscopia de fluorescência.....	41
3.11. Análise estatística.....	41
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Privação de glicose sensibiliza células GBM1 e diminui a viabilidade junto a ação agentes antineoplásicos.....	43
4.2. O tratamento com BCNU aumenta de maneira significativa a taxa de morte por apoptose em células de GBM1, sem interferência da restrição de glicose.....	45
4.3. A formação EROS é diferencial em relação à ausência ou presença de glicose e também, para os dois agentes alquilantes TMZ e BCNU.....	46
4.4. A liberação de glutamato pelas células de GBM1 aumenta no grupo tratado com BCNU e submetido à privação de glicose, em comparação às células que permaneceram sem glicose.....	49
4.5. A privação de glicose em combinação ao tratamento com os quimioterápicos TMZ e BCNU interfere no processo da migração das células de GBM1.....	50
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÃO.....	63
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	65
8. REFERÊNCIAS.....	67
9. APÊNDICE.....	77
10. ANEXO.....	79

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Tumores do Sistema Nervoso Central e Glioblastoma Multiforme

Tumores originados de células da glia são chamados de gliomas, sendo os gliomas astrocíticos ou astrocitomas os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) mais comuns. Estes abrangem aproximadamente dois terços de todos os tumores de origem glial. Dentre os outros tipos estão incluídos os oligodendrogliomas, ependimomas e os gliomas mistos (REIFENBERGER e col., 2012; SCHWARTZBAUM e col., 2006). Segundo a estimativa do Instituto Nacional do Câncer - INCA de 2014, o risco estimado de surgimento de câncer do SNC é de 4 a 5 novos casos em 100 mil habitantes no Brasil. Também correspondem à cerca de 2% das neoplasias malignas gerais (Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil, INCA). O surgimento de gliomas é mais comum em adultos acima de 45 anos, apesar de estar presente em todas as faixas etárias, estando entre os dez tipos de tumores mais frequentes em algumas regiões brasileiras, sendo sua incidência mais alta no sexo masculino e entre populações de maior nível socioeconômico, como em países europeus. Parte do aumento na incidência pode ser um reflexo da melhoria e à introdução de novas tecnologias diagnósticas menos invasivas, como a tomografia por emissão de pósitrons (PET Scan) e a ressonância magnética.

As causas de desenvolvimento de tumores cerebrais, assim como de qualquer tipo de tumor, são discutíveis e ainda não determinadas. Estudos epidemiológicos correlacionam possíveis riscos genéticos, comportamentais, de desenvolvimento e influências externas à incidência de tumores cerebrais, com objetivo de reduzir o aparecimento da doença, mas as conclusões são vagas e ainda muito relativas. A exposição a altas doses de radiação ionizante é um dos fatores já determinados como de risco para desenvolvimento de tumores cerebrais; processos inflamatórios e infecciosos, influência genética, dieta e hábitos são frequentemente citados como um conjunto de fatores de risco. Estudos baseados em populações apontam relação entre a incidência de gliomas e a ingestão de fontes de compostos nitrosos como o N-nitrosodimetilamina, utilizados como aditivos alimentares em produtos cárneos com objetivo de conservação (KYRITSIS e col., 2011; SCHWARTZBAUM e col., 2006). Algumas pesquisas epidemiológicas recentes listam fatores genéticos e moleculares como parâmetros de distinção de gliomas. Tomasetti e Vogelstein (2015) estimaram, através de cálculos estatísticos, a correlação entre o número total de divisões de

células tronco em um dado tecido e o risco de desenvolver um tumor neste mesmo tecido durante a vida. A correlação que encontraram sugere que os riscos de se desenvolver um tumor entre tecidos distintos pode ser estimado em base do total de divisões de células tronco característico de cada tipo celular. Além disto, segundo os pesquisadores, a taxa de proliferação das células tronco em qualquer tecido sofre influência de fatores genéticos e ambientais.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece sete tipos distintos de astrocitomas, conforme listado na Tabela 1. Segundo a classificação da OMS, a gravidade das neoplasias do SNC é graduada de I a IV. Os glioblastomas multiformes (GBM), objetos de estudo deste trabalho, são considerados de nível IV, caracterizados como tumores sólidos e altamente invasivos. Estes podem ser derivados de um astrocitoma difuso (nível II) e/ou de um astrocitoma anaplásico (nível III), por progressão maligna das células neoplásicas (JAIN e col., 2011; ALTIERI e col., 2014). A origem dos astrocitomas continua sendo incerta, e teoriza-se que mudanças no controle da expressão gênica por proteínas ligantes de Ácidos Desoxirribonucleicos (ADN), ao longo de mutações específicas, podem induzir transformações malignas em astrócitos, assim como em células tronco neurais, que tipicamente se diferenciam em astrócitos (GALEFFI e TURNER, 2012; TOMASETTI e VOGELSTEIN, 2015).

O GBM é o mais maligno entre os tipos de tumores do SNC, diagnosticados em 10-15% de todos os tumores intracraniais e 50-60% dos tumores astrocíticos. Os glioblastomas podem ser tumores primários, derivados de tecido encefálico e sem evidência de lesão anterior, ou secundários, cuja origem provém de células de astrocitomas de menor graduação ou de outras regiões do organismo, derivados de metástases (REIFENBERGER e col., 2012). O prognóstico é ruim na maioria das vezes, sendo que aproximadamente 12% dos pacientes sobrevivem por mais de 36 meses com tratamento. Histopatologicamente, o que difere os glioblastomas dos tumores de menor grau é a presença de proliferação microvascular e necrose, além da alta celularidade, atipia nuclear, alta atividade mitótica e trombose vascular. As células tumorais nos GBMs são pleomórficas, com alta atividade mitótica e com presença de mitose atípica; são tumores heterogêneos em sua composição celular, onde se encontram células tronco tumorais, células mesenquimais e células do estroma. Além das células neoplásicas, também estão presentes monócitos e macrófagos, que contribuem diretamente para a progressão tumoral pela liberação de

fatores pró-inflamatórios e angiogênicos (REIFENBERGER e col., 2012; SEYFRIED e col., 2012). Muitos tumores acabam por invadir o parênquima neural, e as células tumorais se espalham, tornando a localização do tumor imprecisa, dificultando a ressecção cirúrgica e tornando impossível a total remoção das células neoplásicas. A possibilidade de cura, no caso do GBM, está relacionada às características histopatológicas analisadas em cada caso, que demonstram a malignidade tumoral. As suposições acerca da evolução no caso dos GBMs são escassas, tanto para tumores primários quanto para secundários, e os dados histológicos não são suficientes para diferir a origem de cada tipo (RIEMENSCHNEIDER e REIFENBERGER, 2009).

A intervenção cirúrgica é indicada em quase todos os casos de tratamentos de gliomas em algum ponto, normalmente precedida por radioterapia e quimioterapia. A cirurgia é importante para obtenção de diagnóstico histológico, além de reduzir drasticamente os sintomas da doença e diminuir a área ocupada pelo tumor, implicando em sequelas na maioria dos casos. Apesar da diminuição do tumor realmente ocorrer, os tratamentos, na maioria das vezes, não resultam na cura da doença, pois dificilmente conseguem eliminar todas as células cancerosas, sendo que as chances de ocorrerem recidivas são altas. Além dos tratamentos normais não serem eficazes, a saúde geral do paciente fica debilitada de forma crítica, e muitas vezes o organismo não suporta os efeitos colaterais dos tratamentos comuns, que são considerados extremamente invasivos. O progresso do tratamento de gliomas visando a cura total depende da implementação de terapias adjuvantes às conhecidas, e novas estratégias terapêuticas estão sendo estudadas, com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais das terapias comuns (SEYFRIED e col., 2012).

**Tabela 1. Graduação dos tumores do SNC e suas características segundo a OMS. Adaptado de KLEIHUES e colaboradores (2002).**

<b>Graduação</b>	<b>Características histopatológicas</b>	<b>Tipos de tumores</b>
<b>Grau I</b>	Lesões não infiltrativas, com baixo potencial proliferativo, sem atipias nucleares, mitoses, proliferação endotelial ou necrose	Astrocitoma pilocítico, astrocitoma de células gigantes subependimais, xantastrocitoma pleomórfico e subependimoma
<b>Grau II</b>	Lesões em geral infiltrativas, com atipias nucleares e baixo índice mitótico, sem proliferação endotelial ou necrose	Astrocitoma difuso, oligodendroglioma, ependimoma e oligoastrocitoma misto
<b>Grau III</b>	Lesões infiltrativas, com atipias nucleares e alto índice mitótico	Astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico
<b>Grau IV</b>	Lesões infiltrativas, atipias nucleares, alto índice mitótico, células gigantes multinucleadas, necrose e proliferação endotelial	Glioblastoma multiforme

Legenda: atipatia nuclear: membrana nuclear e cromatina irregulares, anaplasia: perda da morfologia celular em comparação com células normais do mesmo tecido, pilocítico: tumores císticos com prolongamentos celulares em “cabeleira”.

## 1.2 Agentes antineoplásicos: Temozolomida e Carmustina

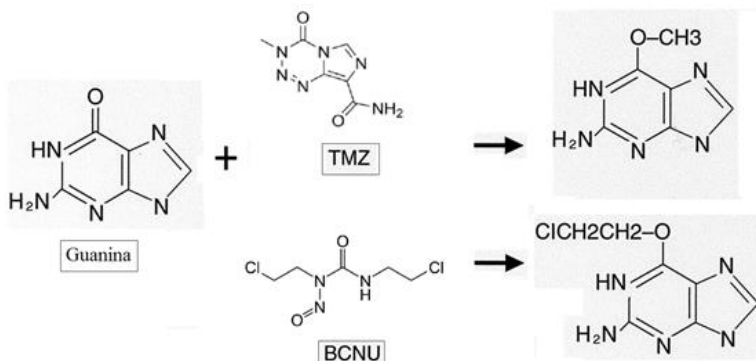
A Carmustina (BCNU) e a Temozolomida (TMZ) fazem parte de uma classe de fármacos citotóxicos conhecidos como alquilantes de ADN. Estas substâncias agem na replicação do material genético, formando adutos inter e intra-cadeia, causando disrupção da estrutura de dupla fita e interferindo na replicação do ADN e na transcrição de genes. O bloqueio da replicação do material genético nas células consequentemente ocasiona apoptose. São considerados agentes alquilantes do ADN as substâncias que modificam covalentemente as moléculas nucleofílicas das células em proliferação. Entre os subtipos de alquilantes, estão as nitrosouréias, que modificam o ADN preferencialmente no oxigênio na posição 6 da base nitrogenada guanina, representados pela TMZ e a BCNU (Figura 1) (CARRILLO e col., 2012).

Carmustina ou BCNU (1,3-bis (2-cloro etil)-1-nitrosourea) é um dos agentes quimioterápicos alquilantes de escolha no tratamento de tumores cerebrais, mielomas e linfomas, sendo utilizada para este fim desde 1977. A carmustina é um dos poucos quimioterápicos aprovados pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration - USA*) para o tratamento de GBM (CARILLO e col., 2012). É uma droga lipofílica e potencialmente atravessa a barreira hematoencefálica, sendo que normalmente é escolhida como terapia adjuvante à rescisão cirúrgica em forma de de pastilhas introduzidas na região do tumor, proporcionando efeito local (PATEL e col., 2014). Os efeitos citotóxicos da carmustina ocorrem devido a sua capacidade de interligação com o ADN, inibindo o crescimento tumoral (JAIN e col., 2011). Este quimioterápico também é conhecido por inibir irreversivelmente a atividade da enzima Glutathione Redutase (GR), em células normais e tumorais. GR é uma das enzimas essenciais para manter a homeostase intracelular pela manutenção da concentração da glutathione citosólica, uma importante molécula antioxidante. A inibição da atividade de GR reduz os níveis de glutathione peroxidase (GPx), o que pode levar ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células. É possível afirmar que a diminuição da atividade da enzima GR pode ser responsável por parte da citotoxicidade da carmustina, pela indução ao estresse oxidativo, ativando cascatas proteolíticas que desencadeiam a apoptose celular (MI AN e col., 2011; MITOZO e col., 2011).

O quimioterápico Temozolomida (TMZ) (*3-methyl-4-oxo-3,4-dihydroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-8-carboxamide*) é um agente alquilante de boa absorção capaz de penetrar a barreira hematoencefálica, utilizado no tratamento de tumores sólidos, em especial para tumores cerebrais. Sua prescrição teve início em 1990, e até então a temozolomida se constitui como quimioterápico de primeira linha para o tratamento de GBMs, unido com a cirurgia de ressecção e radioterapia (JAIN e col.; 2011, SEYFRIED e col., 2014). Após sua absorção, as moléculas de TMZ são metabolizadas no alquilante eletrofílico metildiazônio no citosol, capaz de transferir seu grupo metil para o ADN. O aduto ADN-metil é o principal responsável pela citotoxicidade deste quimioterápico. Além da intervenção direta no ADN, o TMZ tem efeito mitocondrial, afetando a despolarização de membrana destas organelas, desencadeando autofagia, que pode provocar apoptose celular (LIN e col, 2012; VILLANO e col., 2009).

Os dois quimioterápicos descritos agem não somente no alvo ADN, mas também pelo aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON). O excesso de ER causa estresse oxidativo mitocondrial e celular, danifica várias macromoléculas, incluindo o ADN, proteínas e lipídeos (SANCHO-MARTÍNEZ e col., 2012). A eficácia de uma droga quimioterápica depende não somente da sua habilidade de induzir danos ao ADN, mas também da habilidade celular para detectar e responder a esse dano. A procura pelo quimioterápico mais eficiente entre essas classes de drogas é limitada pelo entendimento insuficiente que se tem dos mecanismos de ação destes fármacos (PAPAIT e col., 2009). Apesar de os fármacos quimioterápicos no geral serem constantemente utilizados para o tratamento de tumores cerebrais, estes tem o potencial de aumentar a sobrevida do paciente de maneira modesta, com a consequência dos efeitos colaterais graves, sem certeza de eficiência e com pouca especificidade para a diversidade de casos da doença (SEYFRIED e col., 2015).

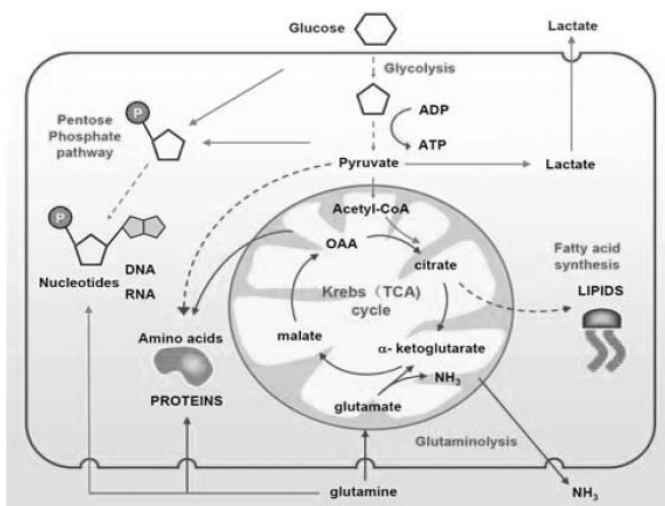




**Figura 1. Alquilação do Oxigênio na posição 6 da base nitrogenada guanina do ADN.** A alquilação forma adutos metilados (TMZ) e cloroetilados (BCNU) que induzem morte celular por apoptose quando o sistema de reparo de ADN está disfuncional. Adaptado de GERON, 2002.

### 1.3 Metabolismo Energético

O metabolismo da glicose no tecido cerebral é igual ao que ocorre em outros tecidos do organismo, e compreende os três passos comuns do processo de obtenção de Adenosina 5' Trifosfato (ATP). A glicose é convertida em piruvato através da glicólise. O piruvato é, então, convertido em acetil-CoA, que entra no Ciclo de Krebs (TCA cycle) em forma de citrato. Citrato também é exportado de volta ao citosol, onde será utilizado na síntese de lipídeos. A glicose também pode ser usada como fonte de carbono na produção de ribose através da via das pentoses-fostato, visando a produção de DNA e RNA. Os intermediários glicolíticos, como o piruvato, são utilizados na produção de aminoácidos não essenciais. As células também necessitam do aminoácido glutamina para produção de outros aminoácidos e proteínas (MAGISTRETTI, 2004; MUÑOS-PINEDO e col., 2012). A Figura 2 ilustra os processos envolvidos no metabolismo de células proliferativas.

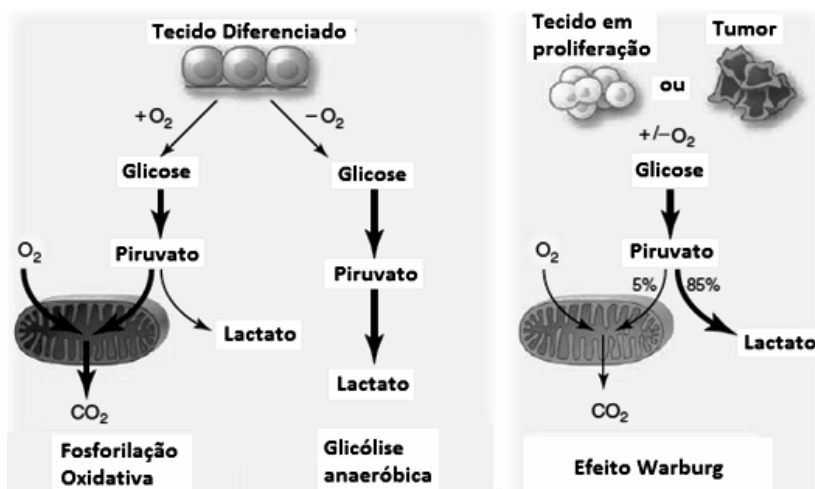


**Figura 2. Metabolismo de células proliferativas.** Reproduzido e adaptado de MUÑOS-PINEDO e col., 2012.

O metabolismo da glicose em astrócitos e em outros tipos celulares pode ser por via de redução a lactato. Através da ação da enzima lactato desidrogenase no processo chamado de glicólise anaeróbica. Essa via é ativada em condições de anóxia e quando o consumo de oxigênio não acompanha a utilização de glicose, tornando a taxa de produção de piruvato maior do que a oxidação deste pelo ciclo do ATC. Essa transição na utilização da glicose e o aumento na produção de lactato ocorre no cérebro humano durante sua ativação na estimulação fisiológica sensorial, segundo a Hipótese da Reciprocidade Astrócito-Neurônio (*ANLSH*) (TURNER e col., 2011). De acordo com essa hipótese, a atividade neural aumenta a concentração extracelular de glutamato, o qual é captado pelas células da glia, estimulando a atividade da  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase e da enzima glutamina sintetase. Esse fenômeno, por sua vez, estimula a glicólise anaeróbica glial, que libera lactato para utilização pelos neurônios como fonte energética (CHIH e col., 2001; DIAZ-RUIZ e col., 2009).

Em 1931 o bioquímico alemão Otto Warburg recebeu um prêmio Nobel por sua pesquisa sobre respiração celular, resultando na observação de que as células cancerosas metabolizam a glicose por via

glicolítica, e seus estudos resultaram na teoria posteriormente conhecida como Efeito Warburg. Esse fenômeno consiste na tendência das células tumorais em metabolizar a glicose em lactato para obter energia, mesmo na presença de oxigênio. Especulou-se que o efeito Warburg possa ser consequência de mutações que afetam o ADN mitocondrial (ADNmt) ou em genes que codificam enzimas do ciclo do ácido carboxílico, pela ativação de genes relacionados com adaptações aos microambientes anormais, no caso, quando ocorre hipóxia, mas uma explicação definitiva para essa mudança no perfil metabólico ainda não foi elucidada (XU e col., 2005; KIM, e col., 2006, VANDER HEIDEN e col., 2009; SEYFRIED e col., 2010; MATHEWS e col., 2011; SEYFRIED e col., 2014). A Figura 2 esquematiza e faz uma comparação entre o metabolismo de células normais e a via metabólica Warburg.



**Figura 3: Diferença entre as vias metabólicas de células de tecido diferenciado, de células proliferativas e de células tumorais.** Quando o oxigênio é limitado, células proliferativas podem utilizar a via glicólise anaeróbica para quebrar a glicose em lactato; alguns tecidos tumorais utilizam preferencialmente a via glicolítica para produção de energia mesmo na presença de oxigênio, caracterizando o Efeito Warburg. Em células tumorais a fosforilação oxidativa também ocorre em menor quantidade. Figura adaptada de VANDER HEIDEN e col., 2009.

#### 1.4 Privação de glicose como tratamento metabólico para gliomas

A glicose é um substrato energético obrigatório para manter as funções cerebrais. O cérebro humano constitui somente 2% de todo o corpo, sendo que para manter seu funcionamento ideal, necessita de aproximadamente 25% da glicose total utilizada por todo organismo. É previsto que o cérebro utilize cerca de 26,6 moles de glicose por 100 gramas de tecido, por minuto. Essa quantidade de glicose não somente serve como fonte energética, como pode ser incorporada pelos astrócitos na forma de glicogênio, que é constituinte essencial para macromoléculas como glicolípídeos e glicoproteínas que estão presentes nas células neurais. (MAGISTRETI, 2004; MUÑOZ-PINEDO e col., 2012). Como dito anteriormente, a troca da quebra da molécula de glicose preferencialmente via glicólise, e a diminuição do metabolismo pela respiração celular, mesmo em condições de normóxia, é uma forma mais rápida de obter substrato energético por possuir menos reações químicas, porém é menos eficiente em termos de geração de ATP por unidade de glicose, o que leva a um aumento na demanda de glicose utilizada pelas células tumorais para sua sobrevivência e proliferação (VIDALI e col., 2015).

A diminuição da oferta de glicose pode ser um alvo para sensibilização de cânceres, via dietas metabólicas como dieta cetônica (DC), com ou sem restrição calórica. Esse tipo de dieta se baseia na ingestão de quatro partes de alimentos ricos em gorduras para uma parte de alimentos contendo carboidratos e proteínas, com objetivo de alcançar o estado cetônico no organismo (MAROON e col., 2013). Teoricamente, a diminuição da energia proveniente da quebra da glicose é capaz de sensibilizar as células tumorais, pelo motivo de que muitos tumores não possuem mecanismos de proteção eficientes para metabolização dos cetônatos, pois suas mitocôndrias podem ter sua funcionalidade diminuída pela grande quantidade de mutações e modificações no DNA celular e mitocondrial. Também os altos níveis de ER podem levar à oxidação de enzimas essenciais para a respiração celular (KLEMENT e col., 2011, OLIVA e col., 2011). Além do fato da diminuição da progressão tumoral, a utilização dos cetônatos como fonte alternativa em vez de glicose, contribui para diminuir os efeitos inflamatórios das terapias antitumorais, diminuem a formação de espécies reativas e tem ação neuroprotetora (SEYFRIED e col., 2012). Por a glicose ser o principal combustível metabólico utilizado em quase todas as funções cerebrais sob condições fisiológicas normais, o cérebro

pode metabolizar corpos cetônicos para produção de energia quando os níveis de glicose se tornam limitados, o que ocorre durante a privação de glicose e a dieta cetônica, em que os níveis de glicose diminuem pela baixa ou nenhuma ingestão de carboidratos na dieta. Quando o organismo se encontra em estado cetônico, os ácidos graxos são oxidados nos três corpos cetônicos que são o acetoacetato, o hidroxibutirato e a acetona nas células do fígado, e são exportados para outros tecidos onde são convertidos em acetil-CoA, e esta abastece o ciclo do ácido cítrico (SEYFRIED e col., 2011; VIDALI e col., 2015). Por exemplo, neonatos, durante a fase de amamentação, tem a capacidade de usar corpos cetônicos como o acetoacetato e o D-3-hidroxibutirato como fontes energéticas, em adição ao uso da glicose. Essa capacidade é um exemplo interessante de um mecanismo adaptativo desenvolvido, pois o leite materno é altamente rico em lipídeos (VANDER HEIDEN e al., 2009).

Estudos *in vivo* como de Safdie e colaboradores (2012) demonstraram que jejum de curto prazo (48 horas) aumentou a eficácia de TMZ e de radioterapia em gliomas implantados em camundongos C57B6, indicando que a restrição de glicose pode ter um efeito evidente no tratamento desta doença. Outro estudo *in vivo* com camundongos implantados com células de glioma da linhagem GL261 (derivada de camundongos) analisou o efeito da DC juntamente com a radioterapia, concluindo que a dieta aumentou significativamente a sobrevivência dos indivíduos dos grupos tratados com radioterapia e também dos que não receberam radioterapia, em comparação a animais que se mantiveram em dieta normal (com ou sem radioterapia). Dentre esses indivíduos, os animais que foram submetidos à DC e receberam radioterapia tiveram regressão total do tumor, até que não fosse mais detectada alguma célula tumoral e com ausência de subsequente recidiva (ABDELWAHAB e col., 2012). Raffaghello e colaboradores (2008) testaram os efeitos da restrição de glicose *in vitro* em cultura mista primária de células da glia como controle, e em linhagens de células de glioma murino (C6, A10–85, 9L, e RG2) e humano (LN229). Os autores verificaram aumento da toxicidade do quimioterápico ciclofosfamida em algumas linhagens de gliomas, o que não ocorreu nas células de cultura primária. Sendo considerada uma nova abordagem para o tratamento de cânceres, os estudos biológicos de parâmetros celulares da aplicação da privação energética são necessários, a fim de elucidar os reais efeitos deste tratamento no metabolismo celular tumoral.

### 1.5. Morte celular

Vários tipos diferentes de morte celular já foram descritos na literatura e cada tipo se diferencia pelos parâmetros biológicos celulares observados: morfológicos - formação de vesículas ou não, comprometimento ou não da integridade membranar, entre outros; - bioquímicos - ativação de caspases, liberação de lactato desidrogenase (LDH), liberação de citocromo c mitocondrial, medição do poder redutor celular. A apoptose e a necrose são os tipos de morte celular mais comuns detectáveis em ensaios para avaliação de morte celular (KRYSKO e col., 2008).

A necrose é caracterizada por inchaço do citoplasma, culminando em ruptura da membrana celular, extravasamento do citoplasma e colapso das organelas. Os processos que podem acarretar em necrose celular compreendem o estresse físico-químico extremo, choque osmótico, estresse mecânico, congelamento e altas concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A liberação dos fatores intracelulares que ocorre na necrose pode levar à inflamação local do tecido por reconhecimento destes fatores pelas células do sistema imune inato (BERGHE e col., 2013).

A apoptose é um processo controlado no qual as células morrem com conservação dos componentes moleculares, caracterizada por mudanças morfológicas e encolhimento da célula pela alta condensação da cromatina, preservação das organelas celulares e formação de corpos apoptóticos e de “bolhas” de membrana celular. A apoptose envolve processos de ativação de cascatas de caspases pró-apoptóticas, a exposição da fosfatidilserina (PS) na face externa da membrana celular e a fragmentação do ADN nuclear (WLODWIC e col., 2010). As mitocôndrias participam diretamente dos eventos de ativação da apoptose. Por exemplo, quando as células recebem um sinal para iniciar o processo apoptótico, uma das consequências é o aumento da permeabilidade da membrana externa mitocondrial, ocasionando a liberação de citocromo c, que ativa uma das enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação proteica durante a apoptose (NELSON e COX, 2012).

Os agentes alquilantes de ADN formam adutos que podem ser pouco reparados, dependendo da capacidade de reparação de ADN da célula, forçando uma parada na replicação e induzindo formação de

quebras na fita de ADN, acarretando na ativação de vias de cascatas apoptóticas e necróticas (GERSON, 2002). A morte celular por apoptose para o tratamento de tumores cerebrais é mais desejada do que por vias necróticas, pois a apoptose é uma forma de morte celular não-inflamatória, diferente da morte por necrose que sempre está associada com liberação de citocinas inflamatórias, liberação de glutamato no nicho tumoral e aumento de angiogênese na região do tumor (SEYFRIED e col., 2012).

#### 1.6. Estresse oxidativo em células de glioma

O estresse oxidativo é resultado de desregulação entre o estado oxidante e antioxidante celular, no qual o ambiente oxidante é favorecido. O estresse oxidativo está diretamente ligado à sobrevivência e proliferação de células tumorais. As mitocôndrias são consideradas as organelas com maior produção de ER. Estes podem ser de oxigênio e nitrogênio, como o radical superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) com o radical hidroxil livre ( $HO^{\cdot}$ ), o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), entre outros. Estes radicais são formados, principalmente, durante a passagem de elétrons através dos complexos mitocondriais da cadeia respiratória, na fosforilação oxidativa (SHI e col., 2012; SOSA e col., 2013, KIM e col., 2014), sendo altamente reativos e podendo danificar enzimas, membranas lipídicas e ácidos nucleicos. Muitos cânceres são metabolicamente ativos e fazem respiração celular em taxas diferenciais. Essas células estão sob efeito de estresse oxidativo, associado com o aumento da atividade metabólica pela alta taxa de proliferação, e esse aumento na formação de EROX pode intensificar o comportamento neoplásico (OLIVA e col., 2011).

A ultra estrutura mitocondrial em tumores cerebrais malignos difere, em questão de marcadores, das mitocôndrias de tecidos normais (SEYFRIED e col., 2014). Estudos que abrangem metabolismo da glicose em células tumorais mostram que na maioria das células cancerosas as mitocôndrias são disfuncionais, contribuindo muitas vezes para que ocorram mutações no ADN nuclear, pelo aumento de ER e livres, capazes de interagir com as moléculas eletricamente ativas naturais das células, como as bases nitrogenadas (GRANDEMANGE e col., 2009 e PELICANO e col., 2006). Esta produção acentuada de ER está relacionada com o aumento da tumorigênese, instabilidade genética e a capacidade de proliferar e invadir tecidos vizinhos pela ativação de vias de fatores de crescimento, o que caracteriza a imortalidade celular e

subsequente transformação maligna do tumor (SINGER e col., 2015). Ao mesmo tempo em que o excesso de ER está relacionado ao aumento da tumorigênese e quimiorresistência, altos níveis de ER também causam danos ao ADN causando instabilidade genômica, prejudicando a proliferação celular e a adesão célula-célula, podendo levar à morte celular por apoptose. Como dito anteriormente, os agentes alquilantes de ADN podem ativar a apoptose pelo aumento na produção de ER, sendo que a resposta de defesa ao estresse oxidativo provocado pela ação destes fármacos depende da síntese de mecanismos antioxidantes endógenos íntegros nas células tumorais, considerando a variedade de mutações presentes nessas células (OLIVA e col., 2011; SOSA e col., 2013). Portanto, identificar e caracterizar os mecanismos envolvidos no estresse oxidativo em células de glioma pode ajudar no desenvolvimento de terapias efetivas para tratamentos.

### 1.7. Importância do glutamato nos processos tumorais

Para a maioria das células de mamíferos em cultura, as duas únicas moléculas catabolizadas em quantidades consideráveis são a glicose e a glutamina. Isso significa que a glicose e a glutamina suprem quase toda a necessidade de carbono, nitrogênio e energia livre necessários para crescimento e divisão celular (MAGISTRETI e al., 2004). A disponibilidade de glutamina como fonte energética no SNC está envolvida com o ciclo glutamato-glutamina. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, porém deve ser removido rapidamente da fenda sináptica para prevenir danos excitotóxicos que podem ser causados aos neurônios. Células da glia possuem transportadores para remover o glutamato extracelular, que então é metabolizado em glutamina para ser devolvido aos neurônios. Neurônios metabolizam glutamina em glutamato, sendo transportado em vesículas sinápticas para liberação. O ciclo glutamina-glutamato mantém os níveis extracelulares baixos de ambas as moléculas do ciclo no parênquima neuronal normal. Disrupção deste ciclo pode prover acesso à glutamina para células neoplásicas de GBM (GROOT e SONTHEIMER, 2011).

Em contraste com células normais da glia, células neoplásicas de glioma secretam glutamato em maiores concentrações. A secreção de glutamato por gliomas aparentemente contribui, em parte, para a excitotoxicidade neuronal e expansão do tumor. A neurotoxicidade causada por traumas mecânicos, radioterapia e quimioterapia pode



também aumentar os níveis extracelulares de glutamato. Além de servir como precursor da síntese de glutamato, a glutamina pode servir como energia metabólica para as células tumorais através do nível de fosforilação do substrato nas mitocôndrias (BLAYLOCK, 2013, LYONS e col., 2014).

Como dito anteriormente, gliomas liberam glutamato em altas concentrações, sendo este um fator multifuncional que favorece a proliferação e a invasão através da migração celular. Células de glioma possuem habilidade de se infiltrar através do tecido cerebral utilizando vasos sanguíneos e fibras nervosas para esse processo, migrando ativamente pelos espaços extracelulares e formando novas massas tumorais descentralizadas (CUDDAPAH e col., 2014; LYONS e col., 2014). Migração é um processo celular em que as células que estão se movendo interagem com moléculas de adesão apresentadas na membrana de diferentes tipos de células e pela matriz extracelular. A ligação das proteínas de adesão aos receptores da matriz geram sinais que regulam a proliferação e migração, sendo que a mudança na homeostase do cálcio representa um dos sinais intracelulares mais importantes envolvidos nesse processo. A indução de mudanças oscilatórias no cálcio intracelular se dá principalmente através da ativação dos receptores AMPA permeáveis à  $\text{Ca}^{2+}$  pelo glutamato extracelular (CUDDAPAH e col., 2014; HAMADI e col., 2014). O papel preciso do glutamato no processo de migração celular e as consequências do aumento da liberação de glutamato no meio extracelular ainda não estão bem elucidadas, especialmente para células de glioma. Sabe-se que as terapias comuns utilizadas para tratamento de tumores cerebrais, principalmente a ressecção cirúrgica e a radioterapia, acarretam em lise e necrose das células da glia e tumorais, possibilitando liberação de glutamato no meio extracelular e contribuindo para a expansão tumoral (SEYFRIED e col., 2012; SEYFRIED e col., 2014).

Estudos que compreendem terapias metabólicas mostram que a restrição de glicose é uma abordagem promissora e com resultados interessantes para tratamento de cânceres, principalmente para tumores cerebrais. A comparação entre os tratamentos quimioterápicos conhecidos com novas oportunidades de atuação de moléculas não tóxicas e tratamento metabólico não invasivo tem sua importância, considerando que os quimioterápicos possuem efeitos colaterais graves e que podem ser determinantes para a debilidade do organismo. Portanto, o estudo da combinação de tratamento quimioterápico com a

restrição de glicose em células de gliomas humanos é uma estratégia importante para o entendimento dos processos biológicos que envolvem a doença, assim como para a descoberta de novas possibilidades de tratamento, visando aumentar a sobrevida de pacientes acometidos por GBM.

Considerando os dados representados pela literatura de que a privação do substrato energético glicose em células tumorais é capaz de influenciar em seu metabolismo e funções biológicas, temos como hipótese a ideia de que a privação de glicose pode ter efeito sinérgico à ação dos fármacos antineoplásicos, possibilitando morte das células por apoptose, alteração nos níveis de espécies reativas de oxigênio, diminuição na liberação de glutamato pelas células e interferência na taxa de migração celular em GBM1.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi analisar os efeitos celulares da privação de glicose, associada ou não ao tratamento com os quimioterápicos carmustina e temozolomida, em culturas primárias de glioblastoma multiforme humano (GBM1) proveniente de ressecção cirúrgica.

### **3.2 Objetivos específicos**

1. Verificar alterações na viabilidade celular de células de GBM1 submetidas à privação de glicose e/ou tratamento com BCNU e TMZ;
2. Analisar os tipos de morte celular (necrose e apoptose) envolvidos;
3. Medir os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) produzido pelas células em cultura, durante e após o tratamento;
4. Analisar a liberação de glutamato em células GBM1, tratadas ou não;
5. Verificar as possíveis interferências do tratamento na migração celular.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Culturas celulares

A cultura primária de glioblastoma multiforme (GBM1) é derivada de um fragmento de tumor obtido pela equipe de neurocirurgia da médica residente Melina Moré, no Hospital Governador Celso Ramos, proveniente de uma cirurgia de ressecção de glioblastoma. O tumor estava localizado no corpo caloso e estendido para o ventrículo lateral esquerdo, sendo diagnosticado por histopatologia como um glioblastoma multiforme grau IV. A utilização das células GBM1 em pesquisas foi devidamente avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPH) e autorizada para esse fim (vide ANEXO). As células GBM1 foram cultivadas em meio de cultura DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's and nutrient mixture F12 – Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab<sup>®</sup>) em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram tripsinizadas (Trypsina-EDTA, 0,05%; Gibco<sup>®</sup>), e semeadas em placas de 24 poços (10<sup>5</sup> células por poço) ou placas de 96 poços (10<sup>4</sup> células por poço), e submetidas aos ensaios assim que atingiram confluência de aproximadamente 80%.

#### 3.2 Tratamento de restrição de glicose

A partir da determinação da confluência das células semeadas nas placas, o meio de cultura de cada poço foi trocado por meio em concentrações diferenciadas de glicose (DMEM No Glucose, Sigma<sup>®</sup>). Como controle foi utilizada a concentração de 2 g/L considerando os dados de níveis de glicose clínicos (0,7-1,44 g/L), essa concentração corresponde à hiperglicemia em organismos saudáveis, mas abaixo do normal em pacientes diagnosticados com GBM (FLAVAHAN e col., 2013). Para mimetizar privação energética, o meio de restrição foi totalmente livre de glicose. Os meios com as duas concentrações foram suplementados com 1% de SFB (Cultilab<sup>®</sup>), sendo que o SFB utilizado é desprovido de acréscimo de glicose. Os níveis de glutamina do meio de cultura foram mantidos.

### 3.3 Tratamento com quimioterápicos

Os quimioterápicos utilizados foram a Carmustina ( $C_5H_9C_{12}N_3O_2$ , BNCU, TCI America<sup>®</sup>) e Temozolomida ( $C_6H_6N_6O_2$ , TMZ, Sigma Aldrich<sup>®</sup>). De acordo com as instruções do fabricante, a BNCU foi diluída em álcool etílico (99,5%, Synth<sup>®</sup>); TMZ diluído em dimetil-sufóxido (DMSO, Vetec<sup>®</sup>), sendo que as duas drogas foram alíquotadas na concentração de 20 mM. As alíquotas foram diluídas em meio de cultura para o tratamento, em todos os experimentos. Foi determinada a concentração de 400  $\mu$ M como efetiva para diminuição de 10 a 20% da viabilidade em células GBM1, a partir de experimentos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa (Trabalho de Conclusão de Curso) sendo esta a concentração utilizada em todos os tratamentos. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes para cada quimioterápico, totalizando o mínimo N=3 para cada ensaio.

### 3.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A avaliação da viabilidade celular perante os tratamentos citados foi realizada através do ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimeiltiazol-2-il)-2,5-difenilterazólio, Sigma<sup>®</sup>). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, convertido a formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (JACOBSSON e FOWLER, 1999). O ensaio de MTT indica as células que são viáveis e possuem potencial redutor celular compatível com a vida. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e substituído por uma solução de 0,2 mg/ml de MTT em PBS por 2 horas a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, o MTT foi removido e os cristais de formazam reduzido foram solubilizados pela adição de DMSO. A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância, medida em leitora *Multimode Reader Infinite M200 TECAN<sup>®</sup>* a 540 nm.

### 3.5 Quantificação dos níveis intracelulares de EROs

Os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares foram detectados com o uso do componente permeável celular não fluorescente 2',7'- Diclorodihidrofluoresceína Diacetato (DCFH-DA, Sigma<sup>®</sup>). Esse reagente penetra na célula e é deacetilado por esterases

intracelulares em 2',7'- Diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que rapidamente é oxidado em 2',7'- Diclorodihidrofluoresceína (DCF) pelas EROs celulares. A intensidade de fluorescência é proporcional ao nível de EROs do citosol. O reagente DCFH-DA (10  $\mu$ M) foi adicionado com a subsequente incubação das culturas por 30 minutos à 37 °C. A fluorescência foi medida em leitor de placa (*Multimode Reader Infinite M200 TECAN®*) com excitação de 485 nm e emissão de 520 nm.

### 3.6 Ensaio de análise de apoptose e necrose

Para avaliação dos níveis de necrose e apoptose celular foi realizado o ensaio Anexina-V FITC (*Millipore®*) em citometria de fluxo. Após o tratamento proposto, as células em cultura foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS gelado, e então centrifugadas novamente e ressuspensas em tampão de ligação 1x, conforme instruções do fabricante. As células foram então submetidas à citometria de fluxo, onde foram divididas em 4 grupos: células apoptóticas (AnexV+/PI-), necróticas (AnexV-/PI+), células mortas (AnexV+/PI+) e células não marcadas/debris (AnexV-/PI-). Os resultados foram quantificados em citômetro de fluxo *FACSCanto II®*.

### 3.7 Liberação de glutamato

O ensaio de liberação de glutamato foi realizado segundo descrito por Molz e colaboradores (2009). As células foram semeadas em placas de 24 poços e, após confluência, foi realizado o tratamento conforme citado anteriormente. Após 48 horas do tempo de tratamento, o meio de cultura foi removido e as células incubadas com solução salina de Hanks (HBSS) (pH 7,2) por 15 min. Em seguida foi adicionado 0,33  $\mu$ Ci/ml de L-[<sup>3</sup>H] glutamato (concentração final 100  $\mu$ M) por 7 minutos para iniciar a captação. Durante o procedimento os poços com células foram lavados 3 vezes com HBSS gelado para a retirada do excesso de L-[<sup>3</sup>H] glutamato não captado. As células ficaram novamente incubadas por 15 minutos em HBSS e o sobrenadante foi coletado para mensurar a quantidade de L-[<sup>3</sup>H] glutamato liberado. Após a coleta do sobrenadante liberado, as células foram solubilizadas em uma solução de 0,1 N NaOH/ 0,01% SDS. A determinação do conteúdo de L-[<sup>3</sup>H] glutamato foi avaliada em contador de cintilação líquida, em

que a porcentagem de glutamato liberado foi expressa em relação a quantidade total de L-[<sup>3</sup>H]glutamato.

### 3.8 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas totais das amostras foi preparada em placas de ELISA de 96 poços; 10<sup>4</sup> células foram semeadas em cada poço e após confluência, tratadas conforme descrito nos tópicos sobre tratamentos (4.3 e 4.4). O procedimento utiliza albumina bovina sérica (Sigma®) como padrão de comparação e foi realizado tendo como base o método de Lowry e col., 1951.

### 3.9 Migração celular – Ensaio de *Scratch Wound*

O ensaio de proliferação pelo método de *scratch wound* é um método de visualização e quantificação de migração celular que permite análise de parâmetros de migração relacionados à matriz celular e interação célula-célula. Foram utilizadas placas de seis poços para cultivo celular, nos quais 10<sup>6</sup> células de GBM foram semeadas por poço. Após confluência de 80%, foi feito um arranhão central em todos os poços, retirando parte das células da monocamada, utilizando ponteira de volume de 200 µL. Os poços foram lavados com solução de PBS e o meio de tratamento foi adicionado. 5 microfotografias (câmera *Axiocam MRC Carl Zeiss*®) de cada grupo foram obtidas após o procedimento de *scratch* em três tempos em relação ao tratamento (início, 24 horas e 48 horas) por microscópio óptico de fluorescência *Axiovert 40 CFL - Carl Zeiss*®. Foram feitos um total de 3 experimentos independentes. A quantificação foi feita a partir da análise de cinco medidas em *pixel* em cada foto, utilizando o software *Image J*® 1.48V. O ensaio de *scratch wound* foi baseado no protocolo de LIANG e colaboradores, 2007.

### 3.10 Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência das células foi feita com os marcadores fluorescentes Faloidina (liga-se à  $\alpha$  actina citoplasmática) e do Hoechst (Bisbenzimidaz, C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O, se liga às bases nitrogenadas do ADN celular), e teve por fim a avaliação da morfologia das células após



o tratamento proposto. Foram semadas  $10^5$  células de GBM em placas de 24 poços com lamínulas, e submetidas ao tratamento citado anteriormente após confluência. Após o tratamento, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS, seguido de fixação com paraformaldeído 4% durante 30 minutos as lamínulas foram colocadas sobre lâminas de vidro para microscopia e então examinadas e fotografadas em microscópio óptico de fluorescência *Axiovert 40 CFL - Carl Zeiss®*.

### 3.11 Análise estatística

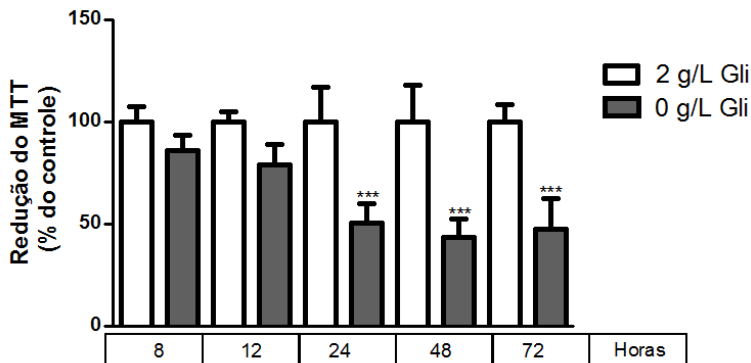
A análise estatística foi realizada através da análise de variância de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls, e variância de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Os dados foram expressos como a média e desvio ou erro padrão, utilizando o software *GraphPad Prism 5.0*. Foram considerados significativos valores com  $p < 0,05$ .



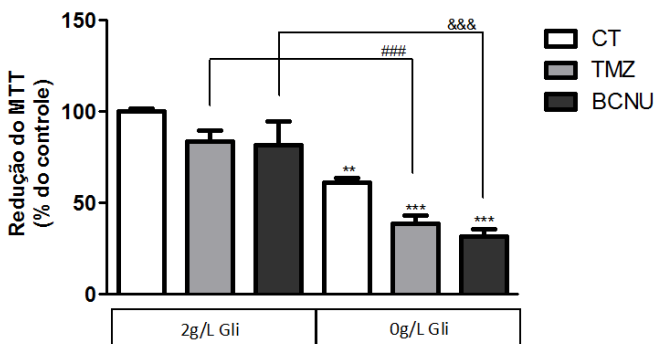
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Privação de glicose sensibiliza células GBM1, diminuindo a sua viabilidade frente ao tratamento com agentes antineoplásicos.

Primeiramente, foi realizado o ensaio de MTT somente com o tratamento de privação de glicose em tempos diferentes para determinação do tempo de tratamento a ser analisado nos ensaios subsequentes. Após 24 horas de restrição de glicose, a viabilidade das células de GBM1 diminuiu aproximadamente 50% e, a partir desse tempo de exposição, a viabilidade das células se manteve estável em 48 e 72 horas de privação energética (Figura 1). O tempo de 48 horas de privação foi escolhido, considerando que nesse tempo a viabilidade celular decaiu para cerca de 50% e, com a ação dos quimioterápicos TMZ e BCNU nas últimas 24 horas de privação, foi possível observar a interferência desses fármacos sobre a população de células que permaneceram viáveis. Nas primeiras 24 horas que compreende a privação de glicose, as células sofreram processo de sensibilização possivelmente pela falta do substrato energético, e nas 24 horas seguintes os quimioterápicos agiram. Em pesquisas feitas anteriormente pelo grupo, em termos de análise da viabilidade celular em curva de concentração para TMZ e BCNU, a ação destes quimioterápicos na concentração de 400  $\mu\text{M}$  por 24 horas provocou diminuição entre 10 e 20% da viabilidade/potencial redutor das células tratadas (dados TCC “Efeitos da restrição de glicose associada ao tratamento quimioterápico sobre a viabilidade celular de GBM1 *in vitro*”). Essa foi a concentração escolhida para os tratamentos em todos os ensaios. A Figura 2 mostra a alteração na viabilidade celular da restrição combinada à ação dos quimioterápicos. Os resultados mostram que a ação dos quimioterápicos na concentração utilizada não teve efeito significativo para na diminuição da viabilidade celular na presença de glicose, e quando submetidas à privação de substrato energético, ocorre sensibilização das células e efeito sinérgico dos dois tratamentos, com diminuição da viabilidade entre 70% para TMZ e 75% para BCNU.

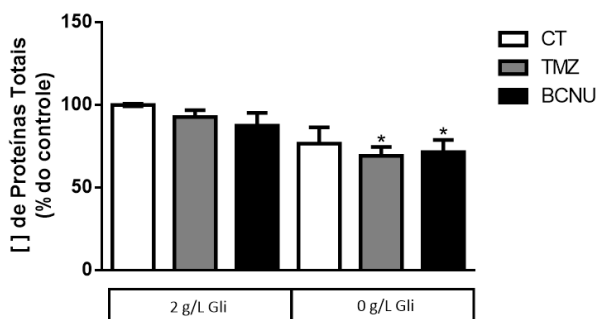


**Figura 1. Efeito da privação de glicose na viabilidade em células de GBM1.** Os valores foram normalizados em relação ao controle. Dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \*\*\* $p < 0.0001$  representando diferença significativa em comparação ao grupo controle de cada tempo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de teste Student-Newman-Keuls).



**Figura 2. Efeito da privação de glicose conjugada ao tratamento com quimioterápicos TMZ e BCNU na viabilidade celular de GBM1 após 48 horas de tratamento.** Os valores foram normalizados em relação ao controle. Dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,001$  representando diferença significativa em comparação ao grupo controle; ### $p < 0,001$  em relação ao grupo 2g/L de glicose e 400  $\mu$ M de TMZ, &&& $p < 0,001$

em relação ao grupo 2g/L de glicose e 400  $\mu$ M de BCNU (ANOVA de uma via seguida de teste Student-Newman-Keuls).



**Figura 3. Concentração de proteínas totais após tratamento em células de GBM1 após 48 horas de tratamento.** Os valores foram normalizados em relação ao controle. Dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$  representando diferença significativa em comparação ao grupo controle 2g/L de glicose (ANOVA de uma via seguida de teste Student-Newman-Keuls).

Dosagem de proteínas totais confirma a diminuição do conteúdo proteico dos grupos submetidos à privação de glicose e ação dos quimioterápicos, representada na Figura 3. Apesar do conteúdo de proteína total não indicar seguramente o número de células viáveis, a alteração do seu perfil do conteúdo com o tratamento juntamente com a diminuição da capacidade redutora representa possivelmente um esgotamento metabólico que culminou na indução de morte celular.

#### **4.2 O tratamento com BCNU aumenta de maneira significativa a taxa de morte por apoptose em células de GBM1, sem interferência do efeito da restrição de glicose.**

A diminuição da viabilidade celular por consequência do tratamento empregado nas células de GBM1 demonstra que este tratamento induz a morte das células. As vias de morte mais comuns

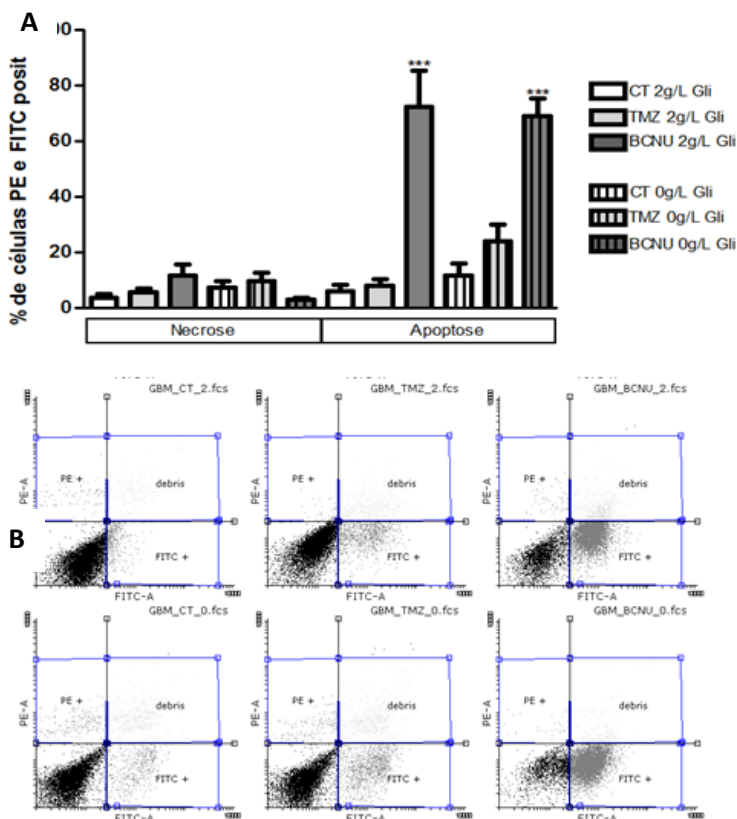
visualizadas em tumores em decorrência da ação de quimioterápicos é a por apoptose e necrose, mas outras vias podem estar envolvidas. (GERSON, 2002; LIN e col., 2012; MI AN e col., 2011; PAPAIT e col., 2009).

O ensaio de morte celular por citometria de fluxo mostrou baixa marcação por iodeto de propídio ( $[2\text{g/L}] = \text{CT } 3,94 \pm 1,08$ ; TMZ  $6,25 \pm 1,19$ ; BCNU  $11,75 \pm 3,91$ ;  $[0\text{g/L}] \text{ CT } 7,63 \pm 2,23$ ; TMZ  $9,93 \pm 2,97$ ; BCNU  $3,13 \pm 0,57$ ). Já a marcação por anexina V, indicando apoptose, foi criticamente mais alta nos grupos tratados com o quimioterápico carmustina ( $[2\text{g/L}] = \text{CT } 6,15 \pm 2,27$ ; TMZ  $11,5 \pm 1,49$ ; BCNU  $72,6 \pm 12,9$ ;  $[0\text{g/L}] \text{ CT } 11,9 \pm 4,03$ ; TMZ  $24,2 \pm 5,77$ ; BCNU  $69,1 \pm 6,23$ ). Dados da literatura demonstraram que a apoptose é a principal via de morte ativada pela ação de quimioterápicos alquilantes de ADN (PAPAIT e col., 2009; SANCHO-MARTÍNEZ e col., 2012), o que se confirma com o tratamento das células com BCNU, mas não com TMZ. Os baixos índices de apoptose nas células tratadas com temozolomida apontam que a via apoptótica não está sendo a causa da diminuição da viabilidade celular nesse grupo. Não houve diferença significativa entre a indução de apoptose nos grupos tratados com BCNU que permaneceram com glicose e nos que foram submetidos à privação da mesma. No ensaio de viabilidade celular, o grupo sensibilizado com a retirada de glicose e submetido ao tratamento com BCNU mostrou diminuição significativa na viabilidade das células em comparação ao grupo que permaneceu com glicose. A Figura 4 ilustra a quantificação do ensaio de morte celular por citometria nas células de GBM1.

### **4.3 A formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) é diferencial em relação à ausência ou presença de glicose como substrato energético e, também, para os dois agentes alquilantes TMZ e BCNU**

Além da indução de morte celular por alquilação do ADN, os dois quimioterápicos utilizados possuem a capacidade de aumentar as taxas de ER que, por sua vez, podem ativar cascatas pró-apoptóticas levando à morte das células tumorais (MI AN e col., 2011). Por essa razão, o ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio foi empregado primeiramente após o tempo de tratamento proposto (48 horas de privação de glicose ou não – 24 horas finais de ação dos

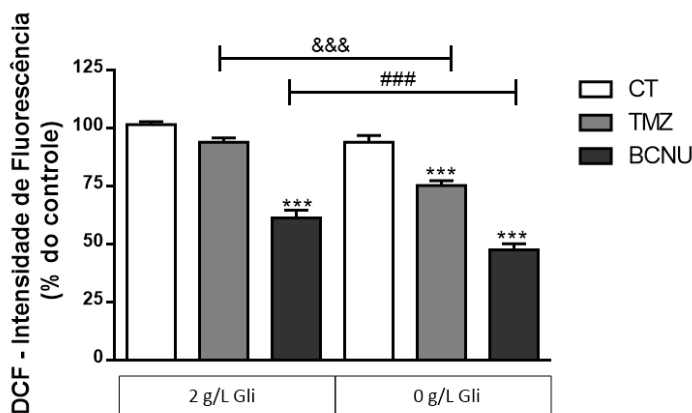
quimioterápicos). Com o resultado obtido foi verificado que o tratamento com BCNU diminuiu a formação de EROs, no grupo com glicose a diminuição foi de cerca de 40% e, no grupo com restrição, a diminuição foi de cerca de 65%. O tratamento com TMZ diminuiu as taxas de produção de EROs em cerca de 25% somente no grupo submetido à privação (Figura 5), em comparação ao grupo controle.



**Figura 4. Quantificação de necrose e apoptose por citometria de fluxo em células de GBM1 após tratamento proposto.** A) quantificação dos resultados por grupo e B) exemplo de análise de citometria de fluxo mostrando as populações de células nos quadrantes FITC+, PE+ e debris. Os valores da quantificação foram normalizados em relação ao controle. Dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,0001$

representando diferença significativa em comparação ao grupo controle 2g/L de glicose (ANOVA de uma via seguida de teste Student-Newman-Keuls).

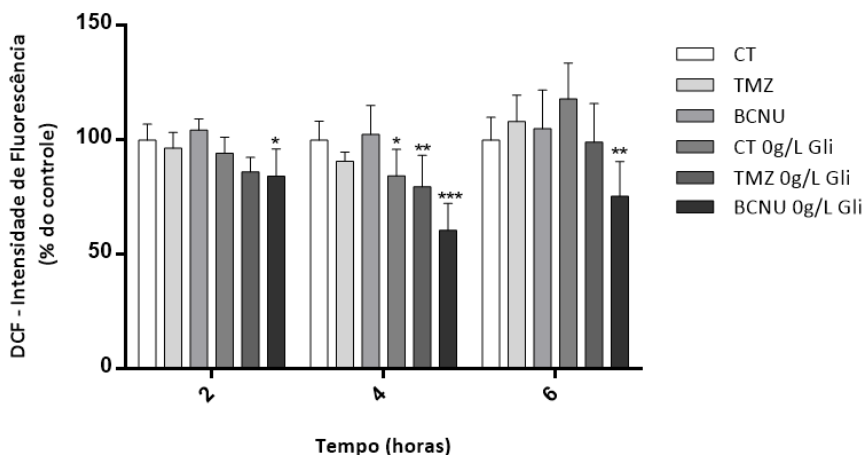
O aumento da concentração de espécies reativas é um processo importante para a indução de apoptose, além da alquilação do ADN provocada pela ação de TMZ e BCNU. Com o intuito de verificar se existe aumento na produção de EROS nas primeiras horas de tratamento, a medição de EROs foi feita em 2, 4 e 6 horas após a adição dos quimioterápicos ao meio de cultura (Figura 6). A diminuição das EROs persistiu nos grupos tratados com BCNU sem glicose nas primeiras horas (cerca de 20% em 2 horas, 40% em 4 horas e 30% em 6 horas), enquanto o controle submetido à restrição e em TMZ sem glicose, há uma baixa significativa de cerca de 20% no tempo de 4 horas de tratamento. Os outros grupos se mantiveram em equilíbrio de EROs em comparação ao controle 2g/L de glicose.



**Figura 5. Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio geradas pelo tratamento com quimioterápicos com ou sem restrição de glicose em células de GBM1 após 48 horas de tratamento.** Dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \*\*\*  $p < 0,05$  significativo em comparação ao grupo controle 2g/L, ### e &&&  $p < 0,05$  significativo em comparação aos



grupos tratados (ANOVA de uma via seguida de teste Student-Newman-Keuls).

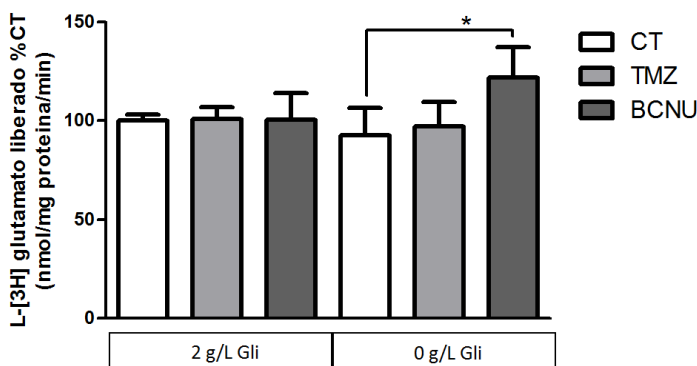


**Figura 6: Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio geradas pelo tratamento com quimioterápicos com ou sem restrição de glicose em células de GBM1 nas primeiras 2, 4 e 6 horas de tratamento.** Os valores foram normalizados em relação ao controle. Dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. \* $p > 0,05$ ; \*\*\* $p > 0,001$  significativo em relação ao controle 2 g/L de glicose. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

#### 4.4 A liberação de glutamato pelas células de GBM1 aumenta no grupo tratado com BCNU e submetido à privação de glicose, em comparação às células que permaneceram sem glicose.

Resultados do nosso grupo mostraram que a liberação de glutamato é maior em células de glioblastoma multiforme *in vitro* (linhagem A172, dados não publicados), sendo que essa alteração foi foco de pesquisas publicadas (YE e SONTHEIMER, 1999; HAMADI e col., 2014; LYONS e col., 2014). As células mantidas em privação do substrato energético glicose e tratadas com o quimioterápico BCNU tiveram taxa de liberação de glutamato significativamente aumentada em relação ao grupo que permaneceu sem glicose pelas 48 horas de

tratamento, nos indicando um resultado de aumento parcial na liberação de glutamato em consequência do tratamento (Figura 7).

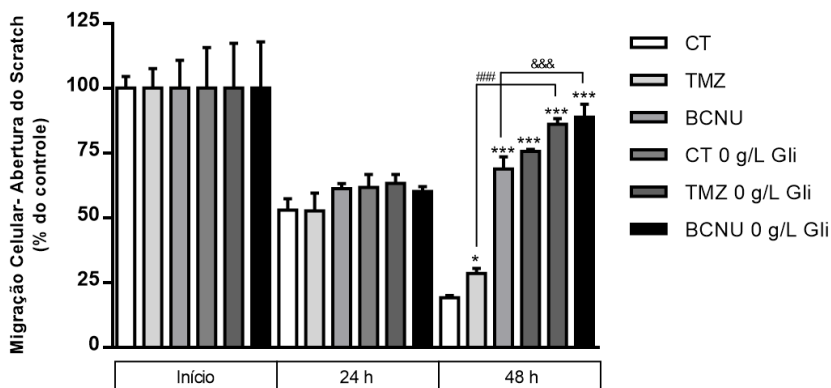


**Figura 7. Ensaio de liberação de glutamato em células de GBM1 após tratamento proposto.** Os valores foram normalizados em relação ao controle. Dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$  representando diferença significativa em comparação ao grupo 0 g/L de glicose (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

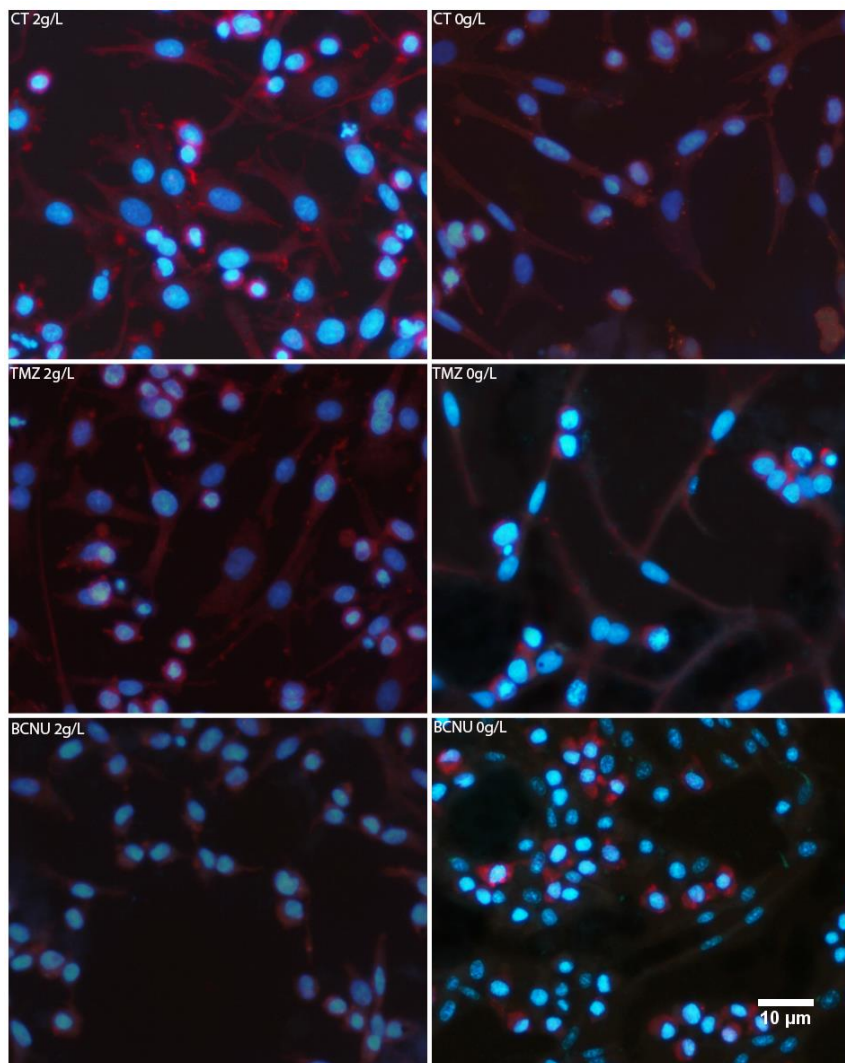
#### 4.5 A privação de glicose em combinação ao tratamento com os quimioterápicos TMZ e BCNU interfere no processo da migração das células de GBM1.

O processo de migração celular em gliomas está relacionado à capacidade destas células de invadir e se infiltrar nos espaços extracelulares do tecido saudável do cérebro, formando novos focos de tumores e dificultando a localização e o tratamento (CUDDAPAH e col., 2014). Para avaliar os efeitos da privação de glicose e dos quimioterápicos na migração de células de GBM1, foi feito o ensaio de *Scratch Wound*, que consiste em fazer um arranhão na monocamada de células, abrindo um espaço que será preenchido posteriormente por células que migraram de outras regiões do poço da placa. Entre os grupos que foram mantidos em meio de cultura com glicose, observou-se alteração na migração por interferência da ação dos quimioterápicos, sendo que o grupo tratado com TMZ apresentou a maior taxa de migração em relação ao grupo tratado com BCNU. BCNU teve maior

ação negativa na migração na presença de glicose. Observou-se que a privação de glicose, por si só, teve efeito negativo direto no processo de migração, e o tratamento conjugado aos quimioterápicos diminuiu de maneira significativa o preenchimento do *scratch*. A comparação entre os grupos mostrou que o tratamento com TMZ tem grande benefício com a retirada da glicose, sendo que a diferença de migração de células é visualmente maior do que comparando os grupos com e sem glicose e tratados com BCNU. BCNU mostrou grande potencial em interferir a migração celular mesmo em presença de glicose e, com a retirada desta, verificou-se uma maior influência negativa na capacidade de migração das células (Figura 8). Além da interferência na migração, durante as análises para registro do ensaio, foi possível observar que a morfologia das células se modifica por consequência dos tratamentos, e fotos ilustrativas foram feitas com marcadores para  $\alpha$  actinina citoplasmática (Faloidina) e marcador de ADN (Hoechst). As células não tratadas apresentam morfologia de astrócito alongado compatível com o tipo celular em cultura e, quando tratadas com os quimioterápicos, a morfologia se altera para ovóide, como ilustra as Figura 9.



**Figura 8. Ensaio *Scratch Wound* de migração celular em células de GBM1 após tratamento com ou sem privação de glicose em combinação a ação de TMZ e BCNU.** Os valores quantificados em pixels a partir de microfotografias com aumento de 10x foram normalizados em relação ao controle. Dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. N = 3, \* $p < 0,05$ , ###, &&& e \*\*\*\* $p < 0,001$  representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (\*), grupo 2 g/L de glicose e TMZ (#) e grupo 2 g/L de glicose e BCNU (&). (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).



**Figura 9: Microfotografias com marcadores fluorescentes Faloidina e Hoechst de células de GBM1 após tratamento. As mitofotografias mostram a mudança morfológica das células após o período de restrição e ação dos quimioterápicos TMZ e BCNU.**

#### 4. DISCUSSÃO

A restrição de glicose como uma possível terapia metabólica para gliomas compreende a aplicação dos princípios de bioenergética para o controle da doença, tendo como alvo a diferença de metabolismo de células tumorais e não tumorais, considerando a preferência dos tumores ao substrato energético principal utilizado pelas células do SNC, a glicose (SEYFRIED e col., 2010). Como foi possível observar em nossa primeira análise, no ensaio de viabilidade celular para restrição de glicose após 24 horas de privação, temos uma baixa de 50 % na quantidade de células que se permaneceram viáveis e, em 48 e 72 horas de privação, essa taxa se mantém estável.

Dois pontos são relevantes para a ocorrência deste fato, um deles é a alta frequência de proliferação destas células em cultura pelos diferentes tempos de tratamento, e também a inerente seleção das células mais aptas à sobrevivência com a retirada da glicose. Considerando que uma cultura primária derivada de ressecção de tumor possui diversidade genética em sua população, a presença de células com potencial metabólico diferenciado é plausível, assim como a presença de células tronco de gliomas, também conhecidas como células iniciadoras de tumor cerebral (BTICs, do inglês *Brain Tumor Initiating Cells*). As células tronco de gliomas são favorecidas em um ambiente com baixo fornecimento de glicose e oxigênio, como nas áreas de necroses tumorais (FLAVAHAN e col., 2013). Pesquisas que avaliaram o efeito da restrição de glicose em células de gliomas *in vitro* mostram que a restrição de glicose promove o fenótipo celular de células iniciadoras de tumor, que possuem perfis moleculares diferenciados, o que permite uma adaptação metabólica dependendo do suprimento energético disponível (FLAVAHAN e col., 2013; YE e col., 2013).

Células com alta taxa de proliferação, como as células tumorais, necessitam produzir proteínas e nucleotídeos em larga escala e, conseqüentemente, requerem altos níveis de glicose e de glutamina para suprir suas necessidades metabólicas. A glutamina é um aminoácido não-essencial e mais abundante no plasma sanguíneo, podendo ser sintetizada a partir da glicose e também estando presente na formulação dos meios de cultura de células *in vitro*. Para ser utilizada como combustível mitocondrial, a glutamina é metabolizada para formar  $\alpha$ -cetoglutarato, e este entra no ciclo do ATC na matriz mitocondrial

(DIAZ-RUIZ e col, 2009; VENNETI e col., 2015; WISE e col., 2010). Segundo a teoria do efeito Warburg, vários tipos de células cancerosas consomem glicose avidamente e produzem ácido láctico preferencialmente pelo processo de glicólise, ao invés de catabolizar o substrato por via do ciclo ATC e OXPHOS, por conta das altas taxas de mutação gênica presentes nessas células, que podem causar prejuízo na síntese de enzimas necessárias para a manutenção das reações metabólicas (JOSE e col., 2011). Essas informações sugerem que, mesmo com presença de glutamina, a retirada da glicose interfere diretamente na produção de ATP, o que pode estar acarretando a baixa da viabilidade nas células de GMB1 submetidas à restrição e, consequentemente, selecionando as células com maior potencial de produção de energia através do ciclo ATC e OXPHOS que utilizam a glutamina como substrato.

O ensaio de quantificação de células viáveis utilizando a técnica de MTT é uma maneira indireta de medir a atividade metabólica das células, mais especificamente, a atividade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial, que reduz a molécula de MTT produzindo cristal de formazan violeta, que é quantificado por espectrofotometria. A succinato desidrogenase é uma proteína que faz parte do complexo II da membrana interna mitocondrial, e tem participação no ciclo do ATC e na *OXPHOS* (VANDEN BERGHE e col., 2013). Portanto, esse ensaio pode refletir a quantidade de células viáveis e também o status de atividade do metabolismo mitocondrial das células submetidas a um determinado tratamento. Recentemente foi demonstrado que mutações em genes diretamente envolvidos no metabolismo celular, como, por exemplo, genes que codificam desidrogenases mitocondriais, podem estar presentes em diferentes tipos de células tumorais, incluindo gliomas (CHESNELONG e col., 2014; DIMITROV e col., 2015). Esses conhecimentos contribuem para suposição de que os dados obtidos através do ensaio de MTT, com o tratamento de restrição de glicose, nos mostram o potencial metabólico das células adaptadas a utilizar a glutamina como fonte energética através da respiração celular.

Os quimioterápicos utilizados, temozolomida e carmustina, possuem sua citotoxicidade principalmente mediada pela transferência de um grupo metil (TMZ) e cloroetil (BCNU) para o oxigênio na posição 6 da guanina no ADN celular. Esse processo, chamado alquilação, já foi bem determinado para essas substâncias, mas os mecanismos precisos de indução de morte nas células cancerosas por

ação destes fármacos ainda não foi bem elucidado (PAPAIT e col., 2009). Sabe-se que a citotoxicidade dos dois agentes alquilantes em questão são diferentes, sendo que a morte celular causada por agentes cloroetil alquilantes (BCNU) é mais potente, requerendo cerca de 10 lesões no DNA para indução de morte celular, caracterizando uma rápida ação. Os agentes metil alquilantes (TMZ), são capazes de induzir morte celular após aproximadamente 6.000 lesões no DNA celular, o que significa que apresentam citotoxicidade menor e ação mais lenta (GERSON, S. L., 2002). Os resultados que obtivemos por a análise da viabilidade celular pela ação dos quimioterápicos mostram que na concentração empregada (400  $\mu$ M), com a presença de glicose por 24 horas de ação dos quimioterápicos não foram suficientes para diminuição da viabilidade celular em comparação com as células não tratadas. Também observamos que as duas substâncias possuem toxicidade em níveis diferentes nas células de GBM1 no estado de privação de glicose. É possível que a retirada da glicose beneficie a ação desses quimioterápicos.

Sobre a análise dos resultados do ensaio de citometria para IP e Anexina-V, foi observado que as células de GBM1 tratadas com BCNU, tanto na presença quanto na ausência de glicose, apresentam alta marcação para morte celular por apoptose, sendo que a marcação necrótica permaneceu nos mesmos níveis das células não tratadas. No tratamento com TMZ, não observamos diferença significativa na marcação para nenhum dos processos de morte celular. Em comparação com o ensaio de viabilidade celular, que não resultou em diminuição significativa da viabilidade em relação ao controle no grupo tratado com BCNU e mantido com glicose, a alta marcação de apoptose pode representar um estado inicial de indução de apoptose, sendo que a taxa metabólica das células não estaria propriamente inviabilizada, possivelmente pela presença de glicose. Joshi e colaboradores (2012) demonstraram que há reversão do estado apoptótico em células de glioma *in vitro* submetidas à ação do indutor de apoptose estaurosporina, assim como após a retirada do estímulo. Esses dados foram confirmados pela visualização da morfologia das células, ensaio de viabilidade e quantificação de mudanças na morfologia nuclear, durante a ação da estaurosporina, e após a retirada da mesma. Essa reversão ocorreu após 19 horas de tratamento, mostrando recuperação significativa do potencial redutor das células de glioma. Essas informações ajudam a entender porque não foi visualizada diminuição na viabilidade em células tratadas com BCNU que permaneceram com

glicose e, pensando em termos metabólicos, a presença de glicose possibilita obtenção de energia de maneira mais rápida por via de glicólise, beneficiando os processos necessários para recuperação das células pela ação do quimioterápico. Também a diferença na taxa proliferativa das células que permaneceram com glicose pode interferir no tratamento, considerando que utilizamos a mesma concentração do fármaco nos tratamentos de restrição ou não restrição de glicose, e a variação na quantidade de células acarreta em diferenças na metabolização de moléculas citotóxicas e consequentemente, em seus efeitos.

A detecção de morte celular após tratamento com quimioterápico TMZ não resultou em indução significativa de apoptose e necrose nas células de GBM1. Atualmente, TMZ é o fármaco mais amplamente indicado para o tratamento de gliomas, considerando seus menores efeitos colaterais e citotoxicidade mais baixa, em comparação aos outros quimioterápicos, o que propicia menores danos à saúde geral do paciente. Pesquisas que analisaram os mecanismos de ação de TMZ em células de glioma mostraram que esta substância tem a capacidade de induzir paralisação das células nas fases G2/M do ciclo celular associada à via p53, seguida de senescência, além de induzir apoptose através da mesma via. Essas alterações seriam visíveis cerca de 4 dias após o tratamento (PAPAIT e col., 2009). De fato, os resultados que obtivemos corroboram com essas informações, sendo que a diminuição da viabilidade no tratamento com restrição de glicose e TMZ pode estar envolvida com outros processos de morte celular, que não apoptose e necrose. Shen e colaboradores (2014) analisaram as modificações morfológicas, na viabilidade, no ciclo celular, morte celular e proliferação, em células de glioma humano U251 após tratamento com 100  $\mu\text{mol/L}$  de TMZ por diferentes tempos. Com os resultados obtidos, puderam concluir que TMZ diminui a viabilidade celular de maneira tempo-dependente, sem detecção de indução apoptótica, detém as células na fase G2/M do ciclo celular, além de inibir a migração e promover autofagia. Outro estudo demonstrou que TMZ pode induzir autofagia celular por dano mitocondrial em células de glioma, indicando uma resposta de auto-renovação para remoção de mitocôndrias danificadas, após tratar células de glioma humano da linhagem U87 MG com TMZ na concentração de 400  $\mu\text{M}$  em 72 horas (LIN e col., 2012). Esse mesmo estudo indicou que a taxa de apoptose pode ser aumentada quando há bloqueio do estímulo mitocondrial que induz autofagia no tratamento com TMZ.



As células de GBM1 que permaneceram sem glicose por 48 horas não apresentaram marcação para morte celular por apoptose e necrose. Jelluma e colaboradores (2006) analisaram os efeitos da privação de glicose em células de glioma humano U251 MG, em critérios de morte celular, e obtiveram diferença significativa na marcação apoptótica após 24 e 48 horas de restrição, e também constataram aumento na formação de EROS sinergicamente ao aumento de apoptose. Por não termos visualizado o mesmo efeito em células de GBM1, podemos levar em consideração as diferenças nos tipos de culturas celulares, considerando que as células GBM1 são derivadas de cultura primária proveniente de ressecção de tumor e, ocasionalmente, pode possuir maior diversidade genotípica e fenotípica entre células de uma mesma cultura, podendo resultar em diferentes respostas aos tratamentos.

A formação de EROS é um parâmetro de análise importante para vários processos celulares, incluindo morte e proliferação, além de complementar a avaliação do status metabólico das células. Referente aos tratamentos propostos para células de GBM1, vemos que, nas células que ficaram sem glicose por 48 horas, EROS está no mesmo nível do controle que permaneceu com glicose. Células de glioma humano em cultura submetidas à restrição de glicose podem vir a morrer por apoptose induzida pela geração de EROS, sugerindo que elas podem adaptar seu metabolismo glicolítico, acionando o metabolismo por respiração mitocondrial (PECQUEUR e col., 2013). A formação de espécies reativas de oxigênio é diferente nos grupos tratados com BCNU, com presença ou não de glicose, e com TMZ durante a restrição. Nesses grupos, há diminuição significativa na formação de EROS, após 48 horas de tratamento, em comparação ao controle não tratado. Para analisar a formação de EROS nas primeiras horas de tratamento com os quimioterápicos, foram feitos ensaios nos tempos de 2, 4 e 6 horas. A formação de EROS para o grupo tratado com TMZ e submetido à restrição acompanha a diminuição da viabilidade/poder redutor nesse grupo após 48 horas, o que pode indicar uma diminuição na taxa de proliferação das células em decorrência do tratamento concomitante à privação de glicose, e as células que permanecem viáveis possivelmente utilizaram a glutamina através do ciclo ATC e OXPHOS para obtenção de energia, tendo como resultado a formação de EROS detectada. Em estudo realizado por Lin e colaboradores (2012) também demonstrou-se que TMZ induz a geração de EROS após 36 horas de tratamento, sendo que esta indução está envolvida com processo de autofagia. Nas

primeiras horas de tratamento os níveis de EROs no grupo TMZ com restrição se mantém ao nível do controle. É possível que esse aumento em EROs possa ser visível com maior tempo de tratamento.

Já os grupos tratados com BCNU mostraram diminuição nas taxas de formação de EROs, tanto na presença quanto na ausência da glicose no meio. BCNU é um inibidor reversível da glutathione redutase, essencial para produção do antioxidante glutathione (MITOZO e col., 2011). Sendo assim, teoricamente, o tratamento com BCNU promove aumento na formação de EROS, mas os resultados que obtivemos não seguiram essa lógica. Mantendo a glicose, o tratamento com BCNU não apresentou aumento significativo de EROs e comparação ao controle não tratado e, retirando a glicose, a formação de EROs diminui de maneira significativa. A inibição da glutathione redutase pode ser um dos principais fatores que acarretou na diminuição drástica da viabilidade e indução de apoptose no tratamento com BCNU mais restrição de glicose, além da alquilação do ADN, que também induz morte por apoptose. Com a prévia sensibilização das células pela retirada de glicose, o tratamento com BCNU pode ter sido altamente citotóxico, inviabilizando as células nas primeiras horas de tratamento. Foi observado que, em duas horas de tratamento a diminuição de EROs nesse grupo (restrição de glicose + BCNU) já se torna detectável, e persiste nas próximas horas, sendo que em 48 horas essa diminuição chega a cerca de 50%. Algumas evidências mostram que células tumorais possuem adaptações a altas concentrações de EROs, ativando fatores de transcrição sensíveis ao equilíbrio redox, mantendo altas concentrações de enzimas antioxidantes como as enzimas superóxido desmutases, ativando a expressão de fatores de sobrevivência e inibindo fatores de morte celular (SHI e col., 2012). Essas adaptações estão envolvidas com o aumento da resistência aos agentes quimioterápicos, como mostrou o estudo de Zhong e colaboradores (1999). Avaliando a atividade das enzimas antioxidantes em células de linhagens de glioma humano e comparando com linhagens de glioma de ratos, mostrou-se que as linhagens humanas sensibilizadas com BCNU – aplicação da concentração de BCNU que inviabiliza 60% das células, variando entre 150 e 50  $\mu$ M, dependendo da linhagem - foram as que apresentaram maior nível de atividade da enzima catalase. Com isso, há a possibilidade de um aumento na produção das defesas antioxidantes em resposta ao desequilíbrio redox provocado pelos quimioterápicos, sendo um ponto interessante para pesquisas futuras.

Em relação ao ensaio de liberação de glutamato por células GBM1, foi observado um aumento significativo no grupo tratado com restrição de glicose e BCNU, em relação ao grupo de células que foi submetido somente à restrição por 48 horas. Esse resultado pode indicar uma tendência das células que permaneceram sem glicose em diminuir seus níveis de liberação de glutamato, sendo que essa hipótese necessita de investigações futuras. Geralmente, as células de glioma liberam altas quantidades de glutamato para o meio extracelular, o que acarreta em na excitotoxicidade em células vizinhas e possibilidade de maior expansão do tumor (GROOT e SONTHEIMER, 2011). O glutamato é produzido pelas células tumorais a partir da glutamina pela ação da enzima glutaminase, que é altamente expressa em alguns tipos de tumores cerebrais, sendo liberado através do sistema Xc-, um trocador de cistina-glutamato, que é altamente expresso em células de glioma (CUDDAPAH e col., 2015; YAO e col., 2014). Cistina é a forma oxidada da cisteína, e a cisteína é um aminoácido envolvido na síntese na enzima GSH, e não pode ser sintetizado intracelularmente, sendo proveniente do meio extracelular. Em células de glioma, o aumento do estresse oxidativo induz aumento do transporte de cistina para dentro da célula, resultando no aumento da biossíntese de GSH (UNGARD e SINGH, 2011). Considerando que BCNU inibe a GR, o aumento parcial na liberação de glutamato pelo grupo submetido à restrição e tratado com BCNU pode indicar o aumento de transporte de cistina, liberando glutamato, com objetivo de compensar a diminuição na produção de GSH nas células.

Células de glioblastoma multiforme possuem a característica de migrarem para regiões distintas do encéfalo, iniciando novas massas tumorais e formando metástases. Essa característica migratória está relacionada com a possível origem dos tumores cerebrais, que podem derivar de células tronco neurais de adultos ou de células progenitoras neurais multipotentes, além de outros tipos de precursores neurais existentes em nichos proliferativos do encéfalo (CUDDAPAH e col., 2014). A inibição do processo de migração é essencial, principalmente para detecção das massas tumorais com maior precisão para avaliação da progressão do tratamento. O ensaio de migração efetuado para células de GBM1 com o tratamento de restrição de glicose mostrou que a privação desse substrato energético é eficiente para diminuição do processo de migração nestas células. Segundo Xie e colaboradores (2014) as células tumorais respondem ao fator de hipóxia com produção de fatores angiogênicos para induzir formação de vasos sanguíneos e

também com o aumento da glicólise. A quebra da glicose via glicólise acarreta no aumento da concentração de lactato, diminuindo o pH do microambiente, o que estimula as células a migrarem e invadirem outros locais (HAN e col., 2013). Considerando que glioblastomas multiformes possuem a característica de conter áreas de necrose isquêmicas e presença de metabolismo glicolítico, a privação do suprimento de glicose consequentemente interfere na capacidade invasiva, também por dificultar o acesso ao substrato energético mais metabolizado pelos tumores. Com relação aos quimioterápicos TMZ e BCNU, a restrição de glicose inibiu a migração no grupo tratado com TMZ. Vimos que, em comparação a 75% do espaço do scratch que foi preenchido com células que migraram, no grupo que se manteve com glicose e submetido à ação de TMZ, quando retiramos a glicose o espaço é preenchido somente em cerca de 25%, sugerindo que as células tiveram maior dificuldade de migrar de outras regiões do poço. O tratamento com BCNU por si só teve grande interferência na migração, sendo que somente cerca de 30% do espaço do scratch foi preenchido, resultado parecido com o que se obteve na retirada de glicose por 48 horas, sendo que a privação resultou no fechamento de cerca de 25%. Também o tratamento com BCNU foi melhorado com a retirada da glicose, mostrando que houve pouca migração das células, cerca de 20%. Esses resultados ajudam a confirmar a alta citotoxicidade de BCNU em comparação com TMZ.

A análise morfológica das células de GMB1 com marcadores fluorescentes Hoechst e faloidina mostraram que as células controle possuem características condizentes com células de glioma em cultura, de proliferação rápida, aspecto fusiforme e núcleos grandes (MACHADO e col., 2005; JOSHI e col, 2012). Quando estas são submetidas ao tratamento de restrição, observa-se que a proliferação diminui, as células adquirem formato arredondado com nítida diminuição de conteúdo citoplasmático. O tratamento com TMZ altera a morfologia das células principalmente em sinergia com a restrição de glicose, com intensa diminuição do citoplasma, perda de contato com células vizinhas e fragmentação da cromatina visível, aspectos estes, condizentes com indução de apoptose (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004). Essas modificações também estão presentes nos tratamentos com BCNU, com e sem glicose. Este trabalho pode ser considerado mais uma evidência de que a restrição de glicose pode ser um benefício empregado juntamente aos tratamentos comuns utilizados para combater tumores cerebrais, considerando a diversidade limitada de antineoplásicos para células de glioma. As possibilidades de terapias

metabólicas precisam ser mais exploradas, pois de fato tem sua importância e validade, e podem chegar a ser a resposta para as dificuldades nos tratamentos contra tumores cerebrais.



## 6. CONCLUSÃO

Com relação aos resultados obtidos, concluímos que:

- A restrição de glicose por si só, age na diminuição da viabilidade de células GBM1 *in vitro* a partir de 24 horas e apresenta, ainda, efeito sinérgico quando empregada com os quimioterápicos TMZ e BCNU em concentração não citotóxica.
- O quimioterápico BCNU tem alta capacidade de induzir morte celular por apoptose em células de GBM1, TMZ, apesar de diminuir a viabilidade, não apresentou marcação para necrose ou apoptose;
- A formação de espécies reativas de oxigênio não foi determinante para induzir citotoxicidade nestas células, considerando que o tratamento com BCNU conjugado à restrição de glicose foi o tratamento mais citotóxico em termos de viabilidade e morte celular com menores níveis de formação EROs;
- Os tratamentos propostos parecem não ter grande influência no processo de liberação de glutamato pelas células GBM1;
- Os quimioterápicos TMZ e BCNU mostraram interferir no processo de migração de GBM1, assim como a restrição de glicose, sendo que a associação dos tratamentos tem maior efeito na migração celular.





## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estudos que possuem como foco quaisquer doenças que não possuem tratamentos que efetivam a cura são essenciais para que se encontrem intervenções definitivas, aplicáveis e acessíveis. Em relação aos cânceres, sendo estes derivados de qualquer órgão, ter como alvo o metabolismo energético destas células de maneira direta, pode ser uma saída para um tratamento real. Estudos já efetuados, sendo eles *in vitro*, *in vivo* ou reportagem de casos clínicos, mostram que a dieta com privação de glicose tem interferência positiva no tratamento de gliomas, sem causar maiores transtornos para as células não tumorais. Um dos maiores desafios em relação ao câncer é a grande diversidade genotípica e fenotípica encontrada, e por essa razão a caracterização das células derivadas de culturas primárias é importante para entender como os diferentes tipos de células tumorais se comportariam sob tratamentos variados. A utilização de inibidores de enzimas relacionadas ao metabolismo energético é um dado importante, e pode responder muitas perguntas. Os tratamentos *in vivo* também são importantes, pela possibilidade de análise da resposta ao tratamento em um contexto de organismo como um todo. Novas técnicas de culturas *in vitro* já estão disponíveis, como a cultura de células tridimensionais, possibilitando observar o comportamento destas células em um nível mais próximo do que seria em um tecido. Pesquisas com diversas substâncias que possuem efeito antioxidante em estudos já publicados demonstraram que algumas delas possuem efeito positivo no tratamento de câncer, sendo que a questão da produção de espécies reativas ainda é um ponto discutível em relação do seu benefício ou malefício na progressão de tumores. O estudo do metabolismo celular tumoral aliado à privação de substratos energéticos e ao uso de substâncias de efeitos diversos é uma linha de pesquisa com muitas possibilidades e grande capacidade de acréscimo para a cura dessa doença.



## 8. REFERÊNCIAS

ABDELWAHAB, M. G.; FENTON, K. E.; PREUL, M. C.; RHO, J. M.; LYNCH, A.; STAFFORD, P.; SCHECK, A. C. The ketogenic diet is an effective adjuvant to radiation therapy for the treatment of malignant glioma. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–7, 2012.

ALTIERI, R.; AGNOLETTI, A.; QUATTRUCCI, F.; GARBOSSA, D.; CALAMO SPECCHIA, F. M.; BOZZARO, M.; FORNARO, R.; MENCARANI, C.; LANOTTE, M.; SPAZIANTE, R.; DUCATI, A. Molecular biology of gliomas : present and future challenges. **Translational Medicine**, v. 10, n. 7, p. 29–37, 2014.

BLAYLOCK, R. L. Immunoexcitatory mechanisms in glioma proliferation, invasion and occasional metastasis. **Surgical Neurology International**, v. 4, p. 15, 2013.

CARRILLO, J. A.; MUNOZ, C. A. Alternative Chemotherapeutic Agents: Nitrosoureas, Cisplatin, Irinotecan. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 23, n. 2, p. 297–306, 2012.

CHESNELONG, C.; CHAUMEIL, M. M.; BLOUGH, M. D.; AL-NAJJAR, M.; STECHISHIN, O. D.; CHAN, J. A.; PIEPER, R. O.; RONEN, S. M.; WEISS, S.; LUCHMAN, H. A.; AND CAIRNCROSS J. G. Lactate dehydrogenase A silencing in IDH mutant gliomas. **Neuro Oncology**, v. 16, n. 5, p. 686–695, 2014.

CUDDAPAH, V. A.; ROBEL, S.; WATKINS, S.; SONTHEIMER, H. Review: A neurocentric perspective on glioma invasion. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 455–65, 2014.

DIAZ-RUIZ, R.; URIBE-CARVAJAL, S.; DEVIN, A.; RIGOLET, M. Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1796, n. 2, p. 252–265, 2009.

DIMITROV, L. HONG, C. S.; YANG, C.; ZHUANG, Z.; HEISS, J. D. New developments in the pathogenesis and therapeutic targeting of the IDH1 mutation in glioma. **International Journal of Medical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 201–213, 2015.

DOLECEK, T. A.; PROPP, T. M.; STROUP, N. E.; KRUCHKO, C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. **Neuro Oncology**, v. 15, n. 5, p. 646-647.

FLAVAHAN, W. A.; WU, Q.; HITOMI, M.; RAHIM, N.; KIM, Y.; SLOAN, A. E.; WEIL, R. J.; NAKANO, I.; SARKARIA, J. N.; STRINGER, B. W.; DAY, B. W.; LI, M.; LATHIA, J. D.; RICH, J. N.; HJELMELAND, A. B. Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 10, p. 1373–82, 2013.

FLORIO, T.; BARBIERI, F. The status of the art of human malignant glioma management: The promising role of targeting tumor-initiating cells. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19-20, p. 1103–1110, 2012.

GALEFFI, F.; TURNER, A. D. Exploiting metabolic differences in glioma therapy. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 9, n. 4, p. 280-293.

GARCÍA-ESCUADERO, V.; GARGINI, R.; IZQUIERDO, M. Glioma regression *in vitro* and *in vivo* by a suicide combined treatment. **Molecular cancer research**, v. 6, n. 3, p. 407–417, 2008.

GERSON, S. L. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 9, p. 2388–2399, 2002.

GRANDEMANGE, S.; HERZIG, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondrial dynamics and cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, n. 1, p. 50–56, 2009.

GROOTS, J., SONTHEIMER, H. Glutamate and the biology of gliomas. **Glia**, v. 59, n. 8, p. 1181-1189, 2011.

HAMADI, A.; GIANNONE, G.; TAKEDA, K.; RONDÉ, P. Abstract Glutamate involvement in calcium-dependent migration of astrocytoma cells. **Cancer Cell International**, v. 14, p. 42, 2014b.

HAN, T. KANGA, D.; JIA, D.; WANGA, X.; ZHANA, W.; FUA, M.; HONG-BO XINA; JIAN-BIN WANGA. How does cancer cell metabolism affect tumor migration and invasion? **Cell Adhesion and Migration**, v. 7, n. 5, p. 395–403, 2013.

JAIN, A.; LAI, J. C. K.; CHOWDHURY, G. M. I. Glioblastoma : current chemotherapeutic status and need for new targets and approaches. **Brain Tumors - Current and Emerging Therapeutic Strategies**, São Paulo- SP, Editora Intech, 2011. cap. 9, p. 146-176.

JELLUMA, N.; YANG, X.; STOKOE, D.; EVAN, G. I.; DANSEN, T. D.; HAAS-KOGAN, A. D. Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 5, p. 319–330, 2006.

JOSE, C.; BELLANCE, N.; ROSSIGNOL, R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 552–561, 2011.

JOSHI, C.; KARUMURI, B.; NEWMAN, J. J.; DECOSTER, M. A. Cell morphological changes combined with biochemical assays for assessment of apoptosis and apoptosis reversal. **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**, p. 756–762, 2012.

KIM, J. W.; DANG, C. V. Cancer's molecular sweet tooth and the warburg effect. **Cancer Research**, v. 66, n. 18, p. 8927–8930, 2006.

KIM, S.-K.; KWON, C.-H.; NAKANO, I. Detoxification of oxidative stress in glioma stem cells: mechanism, clinical relevance, and therapeutic development. **Journal of Neuroscience Research**, v. 92, p. 1419–1424, 2014.

KYRITSIS, A. P.; BONDY, M. L.; LEVIN, V. A. Modulation of glioma risk and progression by dietary nutrients. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n. 2, p. 174–184, 2011.

KLEMENT, R. J.; KÄMMERER, U. Is there a role for carbohydrate restriction in the treatment and prevention of cancer? **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 75, 2011.

KRYSKO, D. V.; VANDEN BERGHE, T.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205–221, 2008a.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIN, C. J.; CHIN-CHENG LEE; SHIH, YUNG-LUEN; LIN, CHIEN-HUANG; WANG, SHENG-HAO; CHEN, THAY-HSIUNG; SHIH, CHWEN-MING. Inhibition of mitochondria- and endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy augments temozolomide-induced apoptosis in glioma cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–13, 2012.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.

LU, J.; TAN, M.; CAI, Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 156–164, 2014.

LYONS, S. A.; JOON CHUNG, W. J.; WEAVER, A. K.; OGUNRINU, T.; SONTHEIMER, H. Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. **Cancer Research**, v. 67, n. 19, p. 9463–9471, 2007.

MAGISTRETTI, P. J. Brain Energy Metabolism. **Neuroscience in the 21st Century**, p. 1591–1620. New York City : Editora Springer. 2013. Cap. 3, p. 67–89.

MAROON, J. e col. Restricted calorie ketogenic diet for the treatment of glioblastoma multiforme. **Journal of child neurology**, v. 28, n. 8, p. 1002–8, 2013.

MATHEWS, E. H.; LIEBENBERG, L.; PELZER, R. High-glycolytic cancers and their interplay with the body's glucose demand and supply cycle. **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 2, p. 157–165, 2011.

MI AN, J.; KIMB, J. J.; RHIE, J. H.; SHIN, D. S.; SEO, S. R.; SEO, J. T. Carmustine induces ERK- and JNK-dependent cell death of neuronally-differentiated PC12 cells via generation of reactive oxygen species. **Toxicology in vitro**, v. 25, n. 7, p. 1359–1365, 2011.

MITOZO, P. A.; DE SOUZA, L. .; LOCH-NECKEL, G.; FLESCHE, S.; MARIS, A. .; FIGUEIREDO, C. P.; DOS SANTOS, A. R. S.; FARINA, M.; DAFRE, A. L. A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 69–77, 2011.

MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; TASCA, C. I. Guanosine-5'-monophosphate induces cell death in rat hippocampal slices via ionotropic glutamate receptors activation and glutamate uptake inhibition. **Experimental Neurology**, v.55, p.703-709. 2009.

MORENO-SÁNCHEZ, R.; SAAVEDRA, E.; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S.; GALLARDO-PÉREZ, J. C.; QUEZADA, H.; WESTERHOFF, H. V. Metabolic control analysis indicates a change of strategy in the treatment of cancer. **Mitochondrion**, v. 10, n. 6, p. 626–639, 2010.

MUÑOZ-PINEDO, C.; EL MJIYAD, N.; RICCI, J.-E. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 1, p. e248, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. **In: Lehninger: Principles of Biochemistry**. Fifth Edition. New York, NY, USA. Copyright, 2012, p. 522-549.

OLIVA, C. R.; MOELLERING, D. R.; GILLESPIE, Y. G.; GRIGUER, C. E. Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 9–13, 2011.

PAPAIT, R.; MAGRASSI, L.; RIGAMONTI, D.; CATTANEO, E. Temozolomide and carmustine cause large-scale heterochromatin reorganization in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379, n. 2, p. 434–439, 2009.

PATEL, M.; KIM, J. E.; RUZEVICK, J.; LI, G.; LIM, M. The Future of Glioblastoma Therapy: Synergism of Standard of Care and Immunotherapy. **Cancers**, v. 6, n. 4, p. 1953–1985, 2014.

PELICANO, H.; MARTIN, D. S.; XU, R-H.; HUANG, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4633–4646, 2006.

PECQUEUR, C. et al. Targeting Metabolism to Induce Cell Death in Cancer Cells and Cancer Stem Cells. **International Journal of Cell Biology**, 2013.

RAFFAGHELLO, L.; LEE, C.; SAFDIE, F. M.; WEI, M.; MADIA, F.; BIANCHI, G.; LONGO, V. D. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8215–8220, 2008.

REIFENBERGER, G.; BLUMCKE, I.; PIETSCH, T.; PAULUS, W. Pathology and classification of tumors of the nervous system. In: Jörg-Christian Tonn, Manfred Westphal, James T. Rutka. **Oncology of CNS Tumors**. New York City, NY. Editora Springer, 2010, p. 3-75.

RIEMENSCHNEIDER, M.; REIFENBERGER, G. Astrocytic Tumors. In: Andreas von Deimling. **Gliomas**. New York City, NY. Editora Springer, 2009, p. 3-24.

SAFDIE, F.; BRANDHORST, S.; WEI, M.; WANG, W.; LEE, C.; HWANG, S.; CONTI, P. S.; CHEN, T. C.; LONGO, V. D. Fasting Enhances the Response of Glioma to Chemo- and Radiotherapy. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–9, 2012.

SANCHO-MARTÍNEZ, S. M.; PRIETO-GARCÍA, L.; PRIETO, M.; LÓPEZ-NOVO, J. M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. F. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: An integrated view. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 136, n. 1, p. 35–55, 2012.

SCHWARTZBAUM, J. A.; FISHER, J. L.; ALDAPE, K. D.; WRENSCH, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nature clinical practice. Neurology**, v. 2, n. 9, p. 494–503, 2006.

SEYFRIED, T. N.; SHELTON, L. M. Cancer as a metabolic disease. **Nutrition & metabolism**, v. 7, p. 7, 2010.

SEYFRIED, T.; MUKHERJE, P.; KALAMIAN, M.; ZUCCOLI, G. The restricted retogenic diet: An alternative treatment strategy for



glioblastoma multiforme. **Treatment Strategies - Brain and Spinal Cord Cancer**, p. 1–12, 2011.

SEYFRIED, T. N.; KIEBISH, M. A.; MARSH, J.; SHELTON, L. M.; HUYSENTRUYT, L. C.; MUKHERJEE, P. Metabolic management of brain cancer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1807, n. 6, p. 577–594, 2011.

SEYFRIED, T. N.; MARSHA, J.; SHELTON, L. M.; HUYSENTRUYTA, L. C.; MUKHERJEE, P. Is the restricted ketogenic diet a viable alternative to the standard of care for managing malignant brain cancer? **Epilepsy Research**, v. 100, n. 3, p. 310–326, 2012.

SEYFRIED, T. N.; MARSHA, J.; SHELTON, L. M.; HUYSENTRUYTA, L. C.; MUKHERJEE, P. Metabolic therapy: A new paradigm for managing malignant brain cancer. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 289–300, 2014.

SHEN, W.; HU, J.-A.; ZHENG, J.-S. Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. **The Journal of international medical research**, v. 42, n. 1, p. 164–72, 2014.

SHI, J.; ZHANG, Y.; ZHENG, J.; PAN, J. Decreasing GSH and increasing ROS in chemosensitivity gliomas with IDH1 mutation. **Tumor Biology**, v. 36, n. 2, p. 655–662, 2014.

SINGER, E. e col. Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 1, p. e1601, 2015a.

SOSA, V.; MOLINÉA, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCIB, R.; KONDOHC, H.; LLEONARTA, M. E. Review: Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390, 2013.

TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **Nature**, v. 347, p. 78-80, 2014.

TURNER, D. A; ADAMSON, D. C. Neuronal-astrocyte metabolic interactions: understanding the transition into abnormal astrocytoma

metabolism. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 70, n. 3, p. 167–176, 2011.

UNGARD, R.; SINGH, G. Oxidative Stress and Glutamate Release in Glioma. **Glioma - Exploring Its Biology and Practical Relevance**. Calcutá- Bengala Ocidental- Índia. Editora Intech. Cap. 20, p. 451–64, 2011.

VANDEN BERGHE, T.; Grootjans, S.; Goossens, V.; Dondelinger, Y.; Krysko, D. V.; Takahashi, N.; Vandenabeele, P. Determination of apoptotic and necrotic cell death *in vitro* and *in vivo*. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 117–129, 2013.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2009.

VENNETI, S.; DUNPHY, M. P.; ZHANG, H.; PITTER, K. L.; ZANZONICO, P.; CAMPOS, C.; CARLIN, S. D.; LA ROCCA, G.; LYASHCHENKO, S.; PLOESSL, K.; ROHLE, D.; OMURO, A. M.; CROSS, J. R.; BRENNAN, C. W.; WEBER, W. A.; HOLLAND, E. C.; MELLINGHOFF, I. K.; KUNG, H. F.; LEWIS, J. S.; THOMPSON, C. B. Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas *in vivo*. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 274, 2015.

VIDALI, S.; AMINZADEHA, S.; LAMBERT, B.; RUTHERFORD, B. T.; SPERLC, W.; KOFLERA, B.; FEICHTINGER, R. G. Mitochondria: The ketogenic diet: A metabolism-based therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 63, p. 55–59, 2015.

VILLANO, J. L.; SEERY, T. E.; BRESSLER, L. R. Temozolomide in malignant gliomas: Current use and future targets. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 647–655, 2009.

WISE, D. R.; THOMPSON, C. B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 8, p. 427–433, 2010.

XIE, Q.; MITTAL, S.; BERENS, M. E. Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. **Neuro-Oncology**, p. 1–10, 2014.

XU, R.; PELICANO, H.; ZHOU, Y. Inhibition of glycolysis in cancer cells : A novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. **American Association for Cancer Research**, n. 2, p. 613–621, 2005.

YAO, P.-S.; KANGA, D.-Z.; LIN, R.-Y.; YE, B.; WANGC, W.; YE, Z.-C. Glutamate/glutamine metabolism coupling between astrocytes and glioma cells: Neuroprotection and inhibition of glioma growth. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 295–299, 2014.

YE, Z. C.; SONTHEIMER, H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. **Cancer Research**, v. 59, n. 17, p. 4383–4391, 1999.

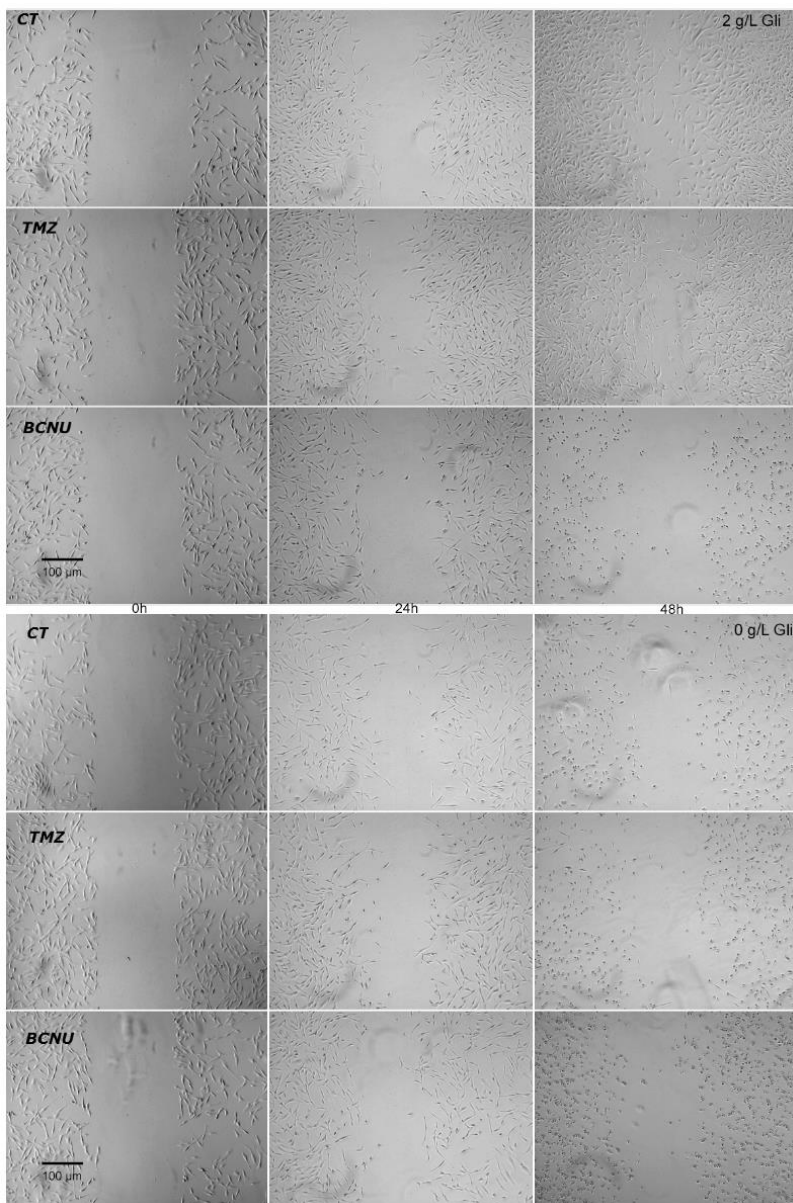
ZHONG, W.; OBERLEY, L. W.; YAN, T.; ST CLAIR, D. K.; DOMANN, E. F. Inhibition damage dismutase of cell growth by overexpression in rat glioma and sensitization of manganese cells. **Cell Growth & Differentiation**, v. 7, p. 1175-1186, 1996.

ZHONG, W.; TAO YAN, T.; LIM, R.; OBERLEY, L. W. Expression of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in glioma cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 11-12, p. 1334–1345, 1999.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 19, n. 10, p. 124–128, 2004.



## 9. APÊNDICE



**Figura 1. Microfotografias do ensaio de Scratch Wound mostrando o arranhão na monocamada de células e seu preenchimento ao longo dos tempos de tratamento – 2 e 0 g/L de glicose, e quimioterápicos TMZ e BCNU na concentração de 400  $\mu$ M (aumento de 4x).**

## 10. ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC




---

**PROJETO DE PESQUISA**


---

**Título:** CARACTERIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS A PARTIR DE GLIOMAS PROVENIENTES DE PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA DE RESSEÇÃO NO HOSPITAL GOVERNADOR CELSO RAMOS, FLORIANÓPOLIS, SC

**Área Temática:**

Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

**Versão:** 1

**CAAE:** 04087112.9.0000.0121

**Pesquisador:** Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

**Instituição:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (Hospital Universitário HU- UFSC)

---

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**


---

**Número do Parecer:** 108.286

**Data da Relatoria:** 24/09/2012

**Apresentação do Projeto:**

O estudo de Aguiar pretende estudar culturas de células de gliomas ressecados de pacientes do Hospital Celso Ramos, Florianópolis.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estabelecer linhagens tumorais primárias a partir de gliomas humanos provenientes de pacientes submetidos a ressecção de tumores no Hospital Celso Ramos, Florianópolis, SC, estudando nestas linhagens os efeitos do tratamento com temozolamida e carmustina na modulação do aminoácido excitatório glutamato e o perfil de células tronco presentes.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos suplantam os benefícios.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Contribuirá sobre o conhecimento generalizável sobre o tema.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE adequado, anuência do HGCR.

**Recomendações:**

Não se aplica

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pela aprovação

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-900  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-9208 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

FLORIANOPOLIS, 26 de Setembro de 2012

---

Assinado por:  
Washington Portela de Souza